

Université de Montréal

**La production de l'anion superoxyde par l'angiotensine, l'endothéline et les voies de
signalisation dépendantes de l'acide arachidonique dans les tissus vasculaires dans
le développement de l'hypertension**

Par

Marc-André Laplante

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Mars, 2007

©Marc-André Laplante

Université de Montréal

Faculté des études supérieures



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Cette thèse intitulée :

**La production de l'anion superoxyde par l'angiotensine, l'endothéline et les voies de
signalisation dépendantes de l'acide arachidonique dans les tissus vasculaires dans
le développement de l'hypertension**

Présentée par :

Marc-André Laplante

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Rousseau.....Président du jury

Dr Jacques de Champlain.....Directeur de recherche

Dr Éric Thorin.....Membre

Dr Richard Larivière.....Examineur externe

Thèse acceptée le : _____



RÉSUMÉ

L'objectif de ce projet était d'identifier et de clarifier les mécanismes responsables de la production d'anion superoxyde dans les cellules de muscles lisses vasculaires du rat et de mesurer l'impact de ces mécanismes dans le développement de l'hypertension.

Nous avons observé que l'angiotensine II augmentait la production aortique d'anion superoxyde et l'activité de la voie ERK-MAPK simultanément à l'élévation de la pression artérielle chez le rat mâle Sprague-Dawley. Nous avons proposé l'existence d'une corrélation entre ces trois facteurs puisque l'activité de la NAD(P)H oxydase dans l'aorte, l'augmentation de la pression artérielle systolique et l'activité de la voie ERK-MAPK dans l'aorte ont été prévenues par un inhibiteur de ERK, le PD98059, par un bloqueur des récepteurs à l'angiotensine II, le losartan, et par le traitement avec un antioxydant, l'acide α -lipoïque.

Nous avons également proposé une association entre la production soutenue d'anion superoxyde et la synthèse d'endothéline-1 par l'angiotensine II dans les cellules de muscles lisses vasculaires. Nos études ont démontré que la majeure partie de l'anion superoxyde obtenue après une stimulation des cellules par l'endothéline-1 était produite par la NAD(P)H oxydase. De plus, la production d'anion superoxyde dans les cellules en culture après un traitement soutenu de plus de trois heures à l'angiotensine II pouvait être prévenue par le BQ-123, un antagoniste des récepteurs à l'endothéline et la production d'anion superoxyde dans l'aorte de rats traités chroniquement avec l'angiotensine II

pouvait être prévenue par le LU302872, un antagoniste non sélectif des récepteurs à endothéline.

Finalement, nous avons étudié l'effet oxydant des oméga-3 et oméga-6, acides gras substrats des voies de l'acide arachidonique. Nous avons trouvé que les oméga-6 augmentaient la production de l'anion superoxyde dans les cellules de muscles lisses vasculaires en culture et que cet effet était indépendant des mécanismes associés à l'angiotensine II. Les oméga-3, ainsi que les inhibiteurs de la 12-lipoxygénase ont prévenu cette production d'anion superoxyde. Nous avons aussi montré que la production d'anion superoxyde dans l'aorte de rats Sprague-Dawley était reliée au rapport oméga-6/oméga-3 contenu dans leur régime.

En conclusion, nos expériences montrent que la production de l'anion superoxyde par l'angiotensine II dans l'aorte est un phénomène dépendant de l'activité de la voie ERK-MAPK et de la synthèse de l'endothéline-1 et que cette production est associée étroitement à l'augmentation de la pression artérielle. Cependant, la production aortique d'anion superoxyde associée à un ratio élevé oméga-6/oméga-3 est indépendante et potentiellement additive à l'augmentation de la production d'anion superoxyde par l'angiotensine II. Ces expériences mettent en valeur la multiplicité des sources de radicaux dans le système vasculaire suggérant la nécessité de revoir les stratégies existantes pour améliorer les approches thérapeutiques antioxydantes.

Mots clés : Muscles lisses, acide arachidonique, voie ERK-MAPK, acide docohexaénoïque, acide eicosapentaénoïque, apocynine, NAD(P)H oxydase, lucigénine, lipoxigénase, stress oxydant, endothéline, angiotensine.

SUMMARY

The aim of this thesis is to clarify the mechanisms responsible for the production of superoxide anion in vascular smooth muscle cells and to assess the importance of this production on the development of hypertension.

We have observed that angiotensin II, in isolated smooth muscle cells and in aorta from Sprague-Dawley rats, increased the superoxide anion production by an increase of ERK-MAPK activity and this production was simultaneously associated with an increased systolic blood pressure. We have also demonstrated that the production of superoxide anion, the increased NAD(P)H oxidase activity and the increase of systolic blood pressure could be prevented by blocking the ERK-MAPK pathway as well as by the treatment with α -lipoic acid, a potent antioxidant. We have thus established a close correlation between the superoxide anion production, the ERK-MAPK activity and systolic blood pressure during the development of hypertension induced by angiotensin II.

We also showed that the superoxyde anion production by angiotensin II was associated to an increase of the synthesis of endothelin-1 in vascular smooth muscle cells. Our studies showed that endothelin-1 could activate NAD(P)H oxidase and that this enzyme was responsible of the major part of superoxide anion produced this way. In addition, superoxide anion production in cultured cells after a sustained treatment of angiotensin II was prevented by BQ-123, an antagonism of ETA receptors and the superoxyde anion

production in aorta from rats treated with angiotensin II was prevented by a treatment with LU302872, an ET receptors antagonist.

Finally, we investigated the oxidative effects of omega-3 and omega-6 fatty acids, two substrates of the arachidonic acid dependent pathways. Omega-6 fatty acids increased the superoxide anion production in vascular smooth muscles cells and this effect was independent of the signaling pathways associated with angiotensin II. A combination with omega-3 fatty acids or with inhibitors of 12-lipoxygenase prevented this increase of superoxide anion. We also showed that the production of superoxide anion in the aorta of Sprague-Dawley rats was related to the omega-6/omega-3 ratio in the diet.

In conclusion, our experiments showed that the production of superoxide anion by angiotensin II in the aorta is a process involving the ERK-MAPK pathway and endothelin-1 synthesis and that this production is linked with an increased systolic blood pressure. However, the production of superoxide anion associated with a high omega-6/omega-3 ratio is independent and potentially additive to the production associated with angiotensin II. These experiments show the importance of taking into account the multiple sources of superoxide anion in elaborating novel antioxidant therapeutic approaches.

Keywords : Smooth muscles, arachidonic acid, ERK-MAPK pathway, docohexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, apocynin, NAD(P)H oxidase, lucigenin, lipoxygenase, oxidative stress, endothelin, angiotensin.

TABLE DES MATIÈRES

MEMBRES DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY.....	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
REMERCIEMENTS.....	xxii
 CHAPITRE I – INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	 1
 1. Les maladies cardiovasculaires et l’hypertension artérielle.....	 2
1.2 L’état clinique de l’hypertension.....	6
1.2.1 Les causes de l’hypertension.....	7
1.2.2 L’évolution du traitement de l’hypertension.....	10
1.3 Le développement de l’athérosclérose.....	15
1.3.1 La dyslipidémie.....	16
1.3.2 Le recrutement des cellules immunitaires.....	20
 2. Physiologie, fonction et maladies du système cardio-vasculaire.....	 23
2.1 Physiologie de l’hypertension artérielle.....	24
2.1.1 Contrôle local vasculaire.....	25

2.1.2	Contrôle endocrinien extrinsèque.....	28
2.1.3	Le système nerveux autonome.....	29
2.2	Le système rénine-angiotensine (RA).....	33
2.2.1	Signalisation de l'angiotensine II.....	36
2.3	L'endothéline.....	39
3.	La voie ERK-MAPK.....	44
3.1	Une alternative aux récepteurs à activité tyrosine kinase : les Src.....	46
3.2	Les rôles de la voie ERK-MAPK.....	47
3.3	La voie ERK-MAPK et la maladie cardiovasculaire.....	47
4.	Le stress oxydant ou les radicaux.....	51
4.1	Les principales espèces oxydantes dans les systèmes biologiques.....	52
4.1.1	L'anion superoxyde.....	54
4.1.2	Le radical hydroxyle.....	57
4.1.3	Le peroxyde d'hydrogène.....	58
4.2	Les sources de radicaux dans le système cardiovasculaire.....	60
4.2.1	La chaîne respiratoire mitochondriale.....	60
4.2.2	Les dérivés de l'acide arachidonique et leurs enzymes.....	63
4.2.2.1	Les cyclooxygénases.....	64
4.2.2.1.1	La production de radicaux libres par les cyclooxygénases.....	67
4.2.2.2	Les lipoxygénases.....	69

4.2.2.2.1	Les lipoxygénases et la production de radicaux.....	73
4.2.2.3	Les cytochromes p450 monooxygénases.....	74
4.2.2.4	La synthèse de l'oxyde nitrique (NOS).....	78
4.2.2.4.1	Le découplage de la NOS.....	82
4.2.2.5	La xanthine oxydase.....	83
4.2.2.6	La NAD(P)H oxydase.....	85
4.2.2.6.1	La composition de la NAD(P)H oxydase.....	86
4.2.2.6.2	La NAD(P)H oxydase dans le système cardiovasculaire.....	87
4.2.2.6.3	La stimulation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II.....	89
4.2.2.6.4	L'endothéline et la NAD(P)H oxydase.....	91
4.3	Les dommages moléculaires causés par le stress oxydant.....	93
4.3.1	La peroxydation des lipides.....	93
4.3.2	L'oxydation des protéines.....	96
4.3.3	L'oxydation des glucides.....	99
4.4	Les systèmes antioxydants.....	100
4.4.1	Le cycle des vitamines.....	101
4.4.1.1	L'oxydation des vitamines.....	102
4.4.2	La superoxyde dismutase.....	103
4.4.3	La catalase et la glutathion peroxydase.....	105
4.5	Le stress oxydant en clinique.....	106

5.	Les acides gras oméga-3 et 6 et la maladie cardiovasculaire.....	111
5.1	Les bénéfices cardiovasculaires associés aux oméga-3.....	115
5.1.1	Les effets anti-arythmiques.....	115
5.1.2	Les oméga-3 et l'athérosclérose.....	116
5.2	Les effets des oméga-6.....	117
5.3	Le ratio oméga-6/oméga-3.....	120
5.4	Le stress oxydant et les oméga-3 et 6.....	123

CHAPITRE II – SOMMAIRE DES OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIES.....126

CHAPITRE III – ARTICLE SCIENTIFIQUE.....133

NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells.

CHAPITRE IV – ARTICLE SCIENTIFIQUE.....167

Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats.

CHAPITRE V – ARTICLE SCIENTIFIQUE.....203

Omega-3 and omega-6 fatty acids in vascular superoxide production in rats

CHAPITRE VI – DISCUSSION.....237

CHAPITRE VII – CONCLUSION.....253

CHAPITRE VIII – SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES.....257

<i>Curriculum Vitae</i>	305
-------------------------------	-----

ANNEXE 1 – Méthode de mesure de l'anion superoxyde par la lucigénine	311
---	-----

ANNEXE 2 – Permissions des éditeurs et des auteurs	314
---	-----

ANNEXE 3 – Réponses aux commentaires des arbitres	321
--	-----

Liste des figures

CHAPITRE 1 – Introduction et revue de la littérature

Figure 1 : Les principaux facteurs du syndrome métabolique.....	4
Figure 2 : Le transport du cholestérol de l'intestin aux tissus.....	20
Figure 3 : Effets du système rénine-angiotensine sur le système nerveux autonome et sites potentiels d'interactions entre les deux systèmes.....	32
Figure 4 : Système rénine-angiotensine et interactions avec le système kinine-kalikréine.....	34
Figure 5 : Signalisation du récepteur AT1 de l'angiotensine II dans les cellules de muscles lisses vasculaires.....	38
Figure 6 : Synthèse de l'endothéline chez l'humain.....	41
Figure 7 : Stimulation de la voie ERK-MAPK par des facteurs de croissance ou par l'angiotensine II.....	45
Figure 8 : Les réactions et les produits de l'anion superoxyde.....	56
Figure 9 : Peroxydation d'une chaîne insaturée lipidique par le radical hydroxyle.....	58
Figure 10 : L'anion superoxyde issu de la chaîne d'électrons mitochondriale.....	62
Figure 11 : Les voies reliées à l'acide arachidonique et la production de radicaux.....	64
Figure 12 : Les produits des cyclooxygénases.....	66
Figure 13 : Hydroxyperoxydation de l'acide arachidonique.....	70
Figure 14 : Les produits des lipoxygénases.....	72
Figure 15 : Réactions de transferts d'électrons dans l'hydroxylation d'un composé par un cytochrome p450.....	76

Figure 16 : Les produits de réactions du NO.....	79
Figure 17 : Production d'anion superoxyde par la NOS découplée.....	82
Figure 18 : Production de radicaux par la xanthine oxydase.....	83
Figure 19 : La stimulation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II.....	90
Figure 20 : Oxydation de l'acide linoléique et formation d'éthane ou d'éthylène.....	94
Figure 21 : Attaque du radical hydroxyle sur un acide aminé.....	97
Figure 22 : Structure du méthylglyoxal.....	99
Figure 23 : Oxydation de l'acide ascorbique.....	102
Figure 24 : Conversion de l'acide α -linoléique en EPA et en DHA.....	112
Figure 25 : La conversion des oméga-6 (acide linoléique en acide arachidonique.....	120
Figure 26 : Différences entre les produits des cyclooxygénases et des lipoxygénases selon le type d'acide gras utilisé.....	122

CHAPITRE III – ARTICLE SCIENTIFIQUE

Figure 1 : (a) Effect of losartan, genistein, PD98059, and alpha-lipoic acid, on the basal superoxide anion production in the aorta of angiotensin II-treated hypertensive rats.....	160
(b) Effects of various therapies on NADH oxidase activity in aorta.....	160
Figure 2 : (a) ERK-MAPK activity measured by western blot in aortas of normotensive rats and rats treated with angiotensin II alone or combined with losartan, genistein, PD98059 or alpha-lipoic acid.....	162
(b) Representative sample of the western blots obtained showing that the	

amount of unphosphorylated ERK was not affected by any of the treatments.....	162
Figure 3 : Correlation between superoxide production and ERK-MAPK activity by linear regression analysis.....	164
Figure 4 : Effects of treatments with angiotensin II alone and combined with the MEK inhibitors PD98059 and U0126 on superoxide anion production in cultured vascular smooth muscle cells.....	165
Figure 5 : Effect of (a) an AT1 blocker losartan, (b) a tyrosine kinase inhibitor, genistein (c) a MEK inhibitor, PD98059 and (d) an antioxidant, alpha-lipoic acid, on the development of angiotensin II-induced hypertension in rats.....	166

CHAPITRE IV – ARTICLE SCIENTIFIQUE

Figure 1 : ET-1 concentration in isolated cultured VSMC chronically incubated with 10^{-6} M angiotensin II for periods varying between 10min to 48 hours...	190
Figure 2 : (a) Time-course for the superoxide anion production in VSMC chronically incubated with 10^{-6} M angiotensin II.....	191
(b) Time-course for the superoxide anion production in VSMC chronically incubated treated with 10^{-7} M ET-1.....	191
Figure 3 : (a) Superoxide anion production in VSMC treated with 10^{-6} M angiotensin II in combination with LU283072 10^{-7} M or BQ-123 10^{-7} M or BQ-3020 10^{-7} M for 10 minutes and 6 hours.....	192

(b) Superoxide anion production in VSMC treated with 10^{-6} M angiotensin II in combination with actinomycin D 1ug/ml for 10 minutes and 6 hours.....	192
Figure 4 : Superoxide anion production in VSMC treated with ET-1 for 6 hours with and without acetovanillone. APO, Acetovanillone (apocynin).....	194
Figure 5 : (a) Nox1 and.....	195
(b) Nox4 expression in VSMC treated with angiotensin II 10^{-6} M combined with the ETA receptor blocker, BQ-123 10^{-7} M, for 6 hours...	196
Figure 6 : (a) Effect of an ETA, ETB receptor blocker, LU302872 (30mg/kg/day), on the development of hypertension and.....	198
(b) on the superoxide anion production in the aorta of rats treated for 12 days with angiotensin II (200ng/kg/min).....	198
Figure 7 : (a) Nox1 and.....	200
(b) Nox4 expression in aorta of rats treated for 12 days with angiotensin II (200ng/kg/min) alone and with LU283072 (30mg/kg/day).....	201

CHAPITRE V – ARTICLE SCIENTIFIQUE

Figure 1: (a) Superoxide anion production in cultured vascular smooth muscle cells treated with different FAs. Treatment were performed with 50 μ M of FAs for 48 hours.....	231
(b) Dose-response effect of varying concentrations of DHA on the superoxide anion production triggered by	

arachidonic acid 50 μ Mol/L.....	231
Figure 2 : Superoxide anion production in cultured vascular smooth muscle cells produced in response to arachidonic acid combined with different inhibitors of arachidonic acid pathways.....	232
Figure 3 : (a) Differences between the mechanisms stimulated by arachidonic acid and angiotensin II for the increase of superoxide anion production in cultured vascular smooth muscle cells.....	233
(b) NAD(P)H oxidase activity in the cells treated with AA, EPA and Ang...	233
Figure 4 : (a) Effects of different diets of Ω -3 and Ω -6 FAs on the systolic and diastolic blood pressure measured by a force transducer linked to a catheter in the femoral artery of Sprague-Dawley rats.....	234
(b) Effects of different diets of Ω -3 and Ω -6 FAs on heart rates of Sprague Dawley rats.....	234
Figure 5 : (a) Production of superoxide anion in aortas from rats receiving different diets of Ω -3 and Ω -6 FAs.....	235
(b) NAD(P)H oxidase activity in the aortae from the different groups.....	235
Figure 6 : 12-HETE levels in the plasma of rats receiving different diets of Ω -3 and Ω -6 FAs.....	236

CHAPITRE VII – DISCUSSION

Figure 1 : La production d'anion superoxyde est un phénomène biphasique.....	243
---	-----

Figure 2 : L'interrelation entre l'angiotensine II et l'endothéline pour l'activation
--

de la NAD(P)H oxydase.....	244
Figure 3 (données non publiées) : Mesure de la production de l'anion superoxyde de cellules de muscles lisses vasculaires en culture traitées à l'angiotensine en combinaison avec de l'EPA (un oméga-3) et de l'AA (un oméga-6).....	247
Figure 4 (données non-publiées) : Mesure de l'anion superoxyde par la dihydroéthidine dans des cellules de muscles lisses vasculaire.....	249

ANNEXE 1 – Méthode de mesure de l'anion superoxyde par la lucigénine

Figure 1 : Réaction de l'anion superoxyde avec la lucigénine.....	313
--	-----

Liste des tableaux

CHAPITRE I – Introduction et revue de littérature

Table 1 : Potentiel de réduction (rédox) de différents radicaux à pH 7.....	81
Table 2 : Composition en acides gras d'huiles domestiques couramment utilisées.....	119

CHAPITRE III – ARTICLE SCIENTIFIQUE

Table 1 : Blood pressure, superoxide production, NAD(P)H activity, ERK-MAPK activity and body weight data of all groups.....	159
--	-----

CHAPITRE V – ARTICLE SCIENTIFIQUE

Table 1 : Products used for cell treatments.....	228
Table 2 : Characteristics of the diet of each group.....	229
Table 3 : Concentration of adrenaline and noradrenaline in the blood of in the different groups of rats.....	230

Liste des sigles

ADN : Acide DésoxyRibonucléique
 ARN : Acide RiboNucléique
 ATP : Adénosine Triphosphate
 CVML : Cellules Vasculaires de Muscles Lisses
 COX : Cyclooxygénase
 CYP450 : Cytochrome p450
 DAG : Diacylglycérol
 DHA : Acide DocosaHexaénoïque
 DOCA: Désoxycorticostérone
 ECA : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
 ECE : Enzyme de Conversion de l'Endothéline
 EDRF : *Endothelium Derived Relaxing Factor*
 EET : Acides EpoxyEicosaTriénoïques
 EGFR : *Endothelial Growth Factor*
 EPA : Acide EicosaPentaénoïque
 ERK-MAPK : *External Regulated Kinase-Mitogen Activated Protein Kinase*
 ET-1 : Endothéline-1
 FADH : Flavine Adénine Dinucléotide
 GPx : Glutathion Peroxydase
 H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène
 HDL : *High Density Lipoprotein*
 HETE : Acides HydroEicosaTetraÉnoïques
 HO• : Radical Hydroxyle
 HPETE : Acides HydroPeroxyEicosaTetraÉnoïques
 ILDL : *Intermediate Density Lipoprotein*
 IP3 : Inositol Triphosphate
 LDL : *Low Density Lipoprotein*
 LOX : Lipoxygénase
 NADH : Nicotinamide Adénine Dinucleotide
 NAD(P)H : Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate
 NO : Oxyde Nitrique
 NOS : Oxydes Nitriques Synthase
 O₂•- : Anion Superoxyde
 PIP2 : Phosphatidyl-Inositol-Diphosphate
 PKC : Protéine Kinase C
 PLA : Phospholipase A
 PLC : Phospholipase C
 PLD : Phospholipase D
 PPAR : *peroxisome proliferation-activated receptor*
 RA : Système Rénine-Angiotensine
 RTC : Transport Inverse du Cholestérol
 SHR : Rat Spontanément Hypertendu
 SOD : Superoxyde Dismutase
 SRS : *slow reaction smooth muscle-stimulating substance*
 VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*

Dédicace

À

Louis Laplante

Le temps dévore, les brèves échappatoires sont la création et le souvenir.

REMERCIEMENTS

Je suis très reconnaissant au docteur Jacques de Champlain pour m'avoir dirigé au cours de ma formation en maîtrise et au doctorat. Le support fourni, autant matériel, académique et scientifique ainsi que l'encouragement du docteur de Champlain pour mettre en œuvre mes initiatives personnelles m'ont fourni un milieu de formation exceptionnellement riche et agréable. Je remercie aussi Diane Papin pour son support technique et son agréable compagnie tout au long de mes travaux ainsi que Carole Champagne et Johanne Payette pour leur support administratif et Rong Wu et Adil El Midaoui qui m'ont fait profiter de leur expérience de recherche. J'aimerais aussi remercier le docteur Pierre Moreau pour son implication dans les collaborations entre nos laboratoires, en particulier pour les travaux sur l'endothéline.

Merci aux organismes subventionnaires qui ont été toujours généreux, en particulier le Fond de la Recherche en Santé de Québec (FRSQ), la Fondation des Maladies du Cœur du Canada (FCC), le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA) et la Faculté des Études Supérieures (FES). Merci aussi aux organismes qui ont offert des bourses de voyage ou des prix de concours tel que la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle (SQHTA), la société Canadienne d'Hypertension Artérielle (CHS), la Société Internationale d'Hypertension (ISH), la Fondation des Maladies du Cœur du Canada (FCC), le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA) et le Groupe de Recherche sur le Médicament (GRUM).

"Si tu travailles avec un marteau-piqueur pendant un tremblement de terre, désynchronise-toi, sinon tu travailles pour rien."

JC Vandamme.

Avant-propos

La recherche n'est pas un chemin droit, ni un voyage organisé. On prend une direction avec un but général, cependant, tout le plaisir vient des détails inattendus qui surviennent sur le passage. La découverte dépend de la vigilance et de la souplesse de l'explorateur. La motivation vient de sa passion pour son sujet.

Cette leçon, peut être pas toujours applicable en pratique, est un des enseignements les plus précieux que je garderai de mon séjour. Mes premières expériences en recherche ont d'ailleurs été marquées de ces expériences dont on ne peut pas trop prévoir la prochaine étape. Tout d'abord, par l'étude de la voie ERK-MAPK dans la production de radicaux libres, ensuite par le fonctionnement de la NAD(P)H oxydase et des effets de l'angiotensine II et de l'endothéline. Le tout sur un fond de diabète et de cyclooxygénases qui m'ont finalement mené à étudier les acides gras, substrats de cette enzyme. Le stress oxydant et les maladies cardiovasculaires étaient mon fil d'Ariane, mais je n'aurais cependant jamais pu prévoir le dénouement de mes aventures.

Mon laboratoire était un lieu d'opportunités et de rebondissements. Nous avons combiné l'étude de cultures cellulaires avec des études *in vivo* chez le rat. Nos principaux intérêts de recherche basés sur les relations entre l'activité de voies cellulaires et des effets physiologiques ont contribué à clarifier le rôle et la dynamique de l'anion superoxyde dans le développement de maladies cardiovasculaires.

J'ai été aussi supporté par un milieu diversifié et surtout ouvert et capable de se laisser influencer par ses membres, telles sont les caractéristiques des groupes de recherches dans lesquels j'ai eu la chance d'évoluer comme le groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA) et le Groupe de Recherche sur le Médicament (GRUM).

CHAPITRE I

Introduction et revue de la littérature

CHAPITRE I – INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Les maladies cardiovasculaires et l'hypertension artérielle

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité dans le monde, incluant même les pays en voie de développement. Au Canada, les maladies du système circulatoire comptent pour 34-36% (homme-femme) de la mortalité totale [1] (Global Cardiovascular Infobase 2000) les infarctus aigus et les accidents cérébrovasculaires étant les causes spécifiques principales.

Selon des données de l' Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la Global Burden of Disease database, 26 facteurs de risques associés aux maladies cardiovasculaires ont été identifiés [2]. Les principaux facteurs étant l'hypertension, le cholestérol, le diabète, l'indice de masse corporelle, la consommation d'alcool et le tabagisme. Les pays en voie de développement, bien que présentant un tableau similaire aux pays industrialisés, subissent également l'influence de la malnutrition et les maladies infectieuses et transmissible sexuellement (SIDA).

L'étude Framingham débutée en 1948 et incluant 5000 patients entre 30 et 62 ans d'une population essentiellement caucasienne avait pour objectif d'identifier les causes principales et d'estimer le risque cardiovasculaire dans la population américaine afin de contrer l'augmentation de l'incidence des ces maladies depuis le début du siècle [3]. Les

principaux facteurs mis en évidence sont la haute pression artérielle, le taux élevé de cholestérol sanguin, le tabagisme, l'obésité, le diabète et l'inactivité physique.

Cependant, l'étude WHO MONICA (*World Health Organisation Multinational MONItoring of trends and determinants in CARDiovascular disease*) a montré que les facteurs de risques pris séparément n'expliquaient pas totalement la variance observée pour les mortalités cardiovasculaires [4]. Variation probablement explicable par le fait que les risques cardiovasculaires sont potentialisés lorsque combinés. Les études de la *National Health and Nutrition Examination* (NHANES I et II) ont d'ailleurs montré que l'addition de facteurs de risques augmente considérablement les chances d'événements cardiovasculaires. Une personne ayant déjà subi un infarctus a deux fois plus de chances de mourir de causes reliées au système cardiovasculaire. Avec un facteur de risque supplémentaire non contrôlé, les chances augmentent à 4,3 fois et avec deux facteurs supplémentaires les chances grimpent à 6 fois [5].

Vers les années 90, la combinaison de certains facteurs de risque souvent associés, a pris la nomenclature de 'syndrome métabolique'. Le syndrome métabolique est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une association de facteurs tels que des changements défavorables du glucose ($>6,1$ mmol/l), une obésité viscérale (index de masse corporelle $> 30\text{kg/m}^2$), une dyslipidémie (triglycérides $>1,69$ mmol/l, HDL $<0,9$ mmol/l) et une hypertension ($>140/90$ mmHg) [6]. Non seulement ces facteurs ont un impact individuel sur la santé vasculaire, mais aussi ont tendance à se développer simultanément chez les patients. Le syndrome métabolique vient changer notre

perception des facteurs pouvant entraîner la mortalité. En effet, une étude effectuée sur des survivants de l'étude MRFIT [7] entre 1980 et 1999 vient montrer que chez les patients souffrant du syndrome métabolique, le taux de glucose sanguin surpassait la pression artérielle élevée pour l'augmentation du risque d'événements cardiovasculaire. Les patients souffrant du syndrome métabolique présentaient aussi un risque global plus élevé que les autres patients [8].

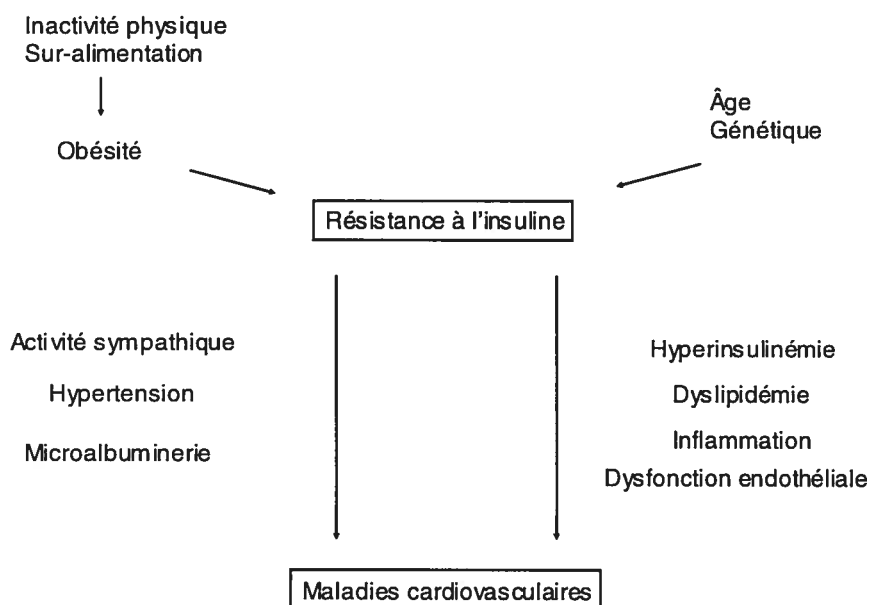


Figure 1 : Les principaux facteurs du syndrome métabolique

Il reste cependant que l'hypertension par elle-même est une cause majeure de la diminution de l'espérance de vie et de la maladie cardiovasculaire. Une étude réalisée sur 3200 personnes de 50 ans au moment du recrutement pour l'étude Framingham a montré que les normotendus avaient une espérance de vie plus longue de 5,1 ans chez les

hommes et 4,9 ans chez les femmes par rapport aux hypertendus. Les normotendus de l'étude (22% de l'échantillon) ont vécu 7,2 ans de plus que les hypertendus sans souffrir de problèmes cardiovasculaires [9].

L'étude MRFIT a démontré l'association de la tension artérielle et la mortalité. Un suivi de l'étude a montré qu'une diminution de la pression systolique et diastolique prévenait de façon plus efficace la mortalité qu'une diminution de la pression systolique, diastolique ou pulsée séparément [10]. En 1956, une étude de Corcoran et al. [11] a montré que les patients hypertendus traités adéquatement présentaient moins de complications athérosclerotiques et vivaient plus longtemps.

À l'an 2000 [12], 26% de la population mondiale adulte souffrait d'hypertension. Ce chiffre en 2025 est estimé à 29%, plus de 1,5 milliards d'individus. La *Canadian Heart Health Survey*, menée entre 1988 et 1992 [13] a montré que 23% des canadiens sont touchés par cette maladie et que seulement 13% des sujets étaient bien contrôlés.

Environ 5 millions de canadiens présentement font de l'hypertension et sur ce nombre, seulement la moitié en sont conscients et moins du quart sont traités. Un patron similaire est observé dans la plupart des pays industrialisés. Malgré l'existence d'une pharmacopée réputée assez efficace pour le traitement de la pression artérielle, plusieurs patients n'atteignent pas les valeurs cibles de pression 140/90 mmHg recommandées par la Société Canadienne d'Hypertension. De plus, 5% des cas d'hypertension sont secondaires à des maladies connues alors que 95% de cas d'hypertension sont primaires impliquant des mécanismes plus ou moins bien définis.

Les études à travers le monde soulignent qu'il y a place à l'amélioration pour le traitement de l'hypertension et que malgré une pharmacopée variée et relativement efficace, une proportion écrasante d'hypertendus dans le monde n'est pas adéquatement traitée. Une autre approche préconisée est la prévention de l'hypertension en incluant des changements d'habitudes de vie. La décroissance de la pression artérielle observée dans plusieurs populations incluses dans l'étude WHO MONICA entre les années 80 et 90 n'est pas attribuable à une diminution des hautes valeurs de pressions ce qui serait la conséquence d'une approche thérapeutique, mais plutôt d'une diminution répartie sur les hautes moyennes et basses valeurs ce qui suggère que les changements globaux sur le mode de vie ont été plus efficace pour contrer l'hypertension à grande échelle [14]. D'autres études ont aussi montré qu'au cours des trois dernières décennies, l'incidence de l'hypertension artérielle semble avoir légèrement diminuée [15], alors que la consommation de sodium est restée sensiblement la même et que la consommation d'alcool et de graisses a diminuée. Cependant, la consommation calorique totale et l'obésité ont augmenté [16].

1.2 L'état clinique de l'hypertension

La définition exacte de l'hypertension relève davantage d'une convention puisque ce désordre est la plupart du temps asymptomatique chez les patients. Chaque organisme définit des valeurs 'cibles' en se basant sur des études cliniques associant un risque d'événements cardiovasculaires à différentes valeurs. La Société Canadienne d'Hypertension recommandait en 2006 une cible inférieure à 140mmHg pour la tension

systolique et inférieure à 90mmHg pour la tension diastolique et une tension inférieure à 130/80mmHg pour des patients diabétiques hypertendus ou ayant des problèmes chroniques rénaux [17].

1.2.1 Les causes de l'hypertension

La plupart des hypertendus (environ 95%) souffrent d'hypertension 'essentielle' ce qui réfère à une hypertension dont les causes ne sont pas déterminées par opposition à une hypertension 'secondaire' qui est une conséquence d'une maladie ou désordre spécifique. Les cas les plus communs d'hypertension secondaire sont des tumeurs ou des activations anormales des glandes endocrines. L'acromégalie, une suractivation de la sécrétion d'hormones de croissance, ou un phéochromocytome sur les glandes surrénales produisant un surplus de catécholamines ou le syndrome de Cushing, qui est une tumeur de la glande corticosurrénale produisant des corticostéroïdes en surabondance ou un hyperaldostéronisme causé par une tumeur ou une hyperplasie des cellules de la glande surrénale sont tous des exemples d'hypertension secondaires. On retrouve aussi des affectations rénales comme la sténose d'une artère rénale qui amène la suractivation du système rénine-angiotensine qui sont considérées comme des causes d'hypertension secondaire.

L'hypertension essentielle se développe graduellement au cours de la vie et n'origine pas d'une cause précise, mais d'un ensemble multifactoriel de conditions environnementales. L'alimentation est un facteur déterminant dans le développement de l'hypertension. Des

études épidémiologiques dans les années 70-80 sur les populations urbaines et rurales des Îles Salomon et des îles du Pacifique ont montré que malgré une espérance de vie plus grande des populations développées urbaines des îles du Pacifique, des facteurs comme l'alimentation et les habitudes de vie augmentent les cas d'hypertension et de maladies cardiovasculaires comparativement aux populations ayant un mode de vie plus primitif [18]. Un régime plus riche en hydrates de carbone, l'obésité et une consommation plus importante de sel ont été proposés comme étant des facteurs pouvant expliquer cette différence [19].

Le développement de l'hypertension a souvent été mis en parallèle avec des régimes spécifiques propres à des populations. Le régime méditerranéen, riche en poissons, huile d'olive, fruit, légumes et vin rouge est un exemple pouvant expliquer des différences de la tension artérielle entre les populations [20]. Un régime riche en sucre favorise l'apparition du diabète de type 2 qui est associé à une détérioration accélérée du système circulatoire. Un régime riche en graisses saturées modifie les systèmes de transport du cholestérol et en augmente le dépôt de lipides dans la paroi des vaisseaux. Un apport trop important en calories combiné avec peu d'exercice entraîne des problèmes d'obésité souvent reliés à une détérioration du système circulatoire conduisant à une élévation de la tension artérielle. D'ailleurs, les liens étroits entre plusieurs facteurs de risques concomitants : l'obésité abdominale, la dyslipidémie, l'hypertension, la résistance à l'insuline (avec ou sans intolérance au glucose ou diabète), la microalbuminurie et l'augmentation de facteurs inflammatoires ou thrombotiques ont été reconnus. Par contre, l'addition de substances possédant des propriétés antioxydantes dans un régime ont

révélé avoir des effets antihypertenseurs. En effet, le cacao, un activateur de la production d'oxyde nitrique très présent dans l'alimentation traditionnelle des indiens Kuna, a démontré son effet protecteur sur les maladies cardiovasculaires chez les indiens consommant leur diète traditionnelle comparativement aux indiens devenus citadins [21]. Le concept de la 'cuisine préventive' est plutôt attrayant et peut constituer un outil de prévention efficace dans l'avenir, bien que le problème de l'adhérence des patients pour la thérapeutique médicamenteuse actuelle risque de s'appliquer également à l'approche diététique.

L'hypertension a été associée aussi au vieillissement dès les premières études réalisées sur le sujet [22]. Cependant, on a observé dans plusieurs populations que la pression artérielle n'augmente pas avec l'âge, par exemple les populations rurales chinoises [23], ce qui laisse présumer que l'âge seul n'est pas un facteur suffisant pour expliquer l'hypertension. Une différence dans le contenu en sel de l'alimentation entre les populations a été postulée comme une explication probable des différences entre les populations rurale et urbaine. Des facteurs génétiques sont aussi impliqués par exemple dans la sensibilité de la réponse hypertensive au sel. Le Projet Européen sur les Gènes en Hypertension (EPOGH) a souligné que l'hypertension est une maladie polygénique et fortement influencée par le milieu et les habitudes de vie [24]. Finalement, un environnement induisant un stress élevé et constant est associé à une suractivation du système sympathique qui a été proposée comme une étape initiale du développement de l'hypertension artérielle menant à une altération de la réabsorption du sodium dans les

tubules rénaux et une augmentation de la sécrétion de la rénine et de la formation d'angiotensine [25].

1.2.2 L'évolution du traitement de l'hypertension

Originellement, l'hypertension était considérée comme un phénomène neurologique et les premiers traitements de l'hypertension consistaient à bloquer la transmission sympathique centrale par des analogues inactifs de l'acétylcholine (hexamethonium par exemple). Cette stratégie inhibait aussi le système parasympathique et entraînait des effets secondaires considérables sur la sudation, l'activité intestinale et la concentration des patients [26]. Ensuite, les patients étaient traités avec des ganglioplégiques tel que le tartrate de pentolinium [27] plus faciles à administrer que l'hexamethonium, mais toujours caractérisés par les effets secondaires de l'inhibition des systèmes sympathiques et parasympathiques : bouche sèche, constipation, frissons, impuissance et hypotension posturale. Cependant, ces premières thérapies pharmacologiques étaient des alternatives plus souhaitables que les traitements précédents dominés par les traitements chirurgicaux tels que des sympathectomies ou des surrénalectomies.

Cependant, il a été observé que la réponse des patients au blocage ganglionnique dépendait de l'accumulation de sel et d'eau dans leur organisme. En effet, les patients sujets à faire des œdèmes développaient une résistance à la thérapie et cette résistance était atténuée par un régime faible en sel. Le développement de médicaments capables d'induire une déplétion moyenne en sel chez ces patients était donc une étape importante

dans le traitement de l'hypertension. Les diurétiques, en particulier la chlorothiazide, ont été graduellement intégrés à la thérapie antihypertensive. Les diurétiques sont des composés qui augmentent l'excrétion du sodium et de l'eau par les reins, réduisant ainsi le volume sanguin et la pression artérielle, bien que certains de leurs effets antihypertenseurs soient indépendants des effets diurétiques. La chlorothiazide, bien que considérablement mieux tolérée que les traitements antérieurs, présente malgré tout certains effets secondaires comme la réduction du potassium sanguin ou l'accumulation d'acide urique dans le sang causant des crises de gouttes. Des cas plus rares de diabète développé suite au traitement ont aussi été rapportés.

Les effets secondaires des bloqueurs ganglionnaires restaient toutefois problématiques et des composés pouvant bloquer sélectivement le système sympathique en épargnant le système parasympathique ont été développés pour solutionner ce problème. Certains de ces composés, comme la guanéthidine et la réserpine étaient capables d'épuiser les stocks de catécholamines dans les vésicules de sécrétion des synapses adrénergiques alors que d'autres composés comme le méthyl dopa empêchaient la formation des catécholamines [28]. Un raffinement des médications sélectives au système sympathique a mené à la découverte du premier β -bloqueur, la dichloroisoprénaline, et ensuite au propranolol, le premier β -bloqueur utilisé avec succès en clinique. Les β -bloqueurs sont des antagonistes des récepteurs β du système sympathique bloquant la stimulation cardiaque, mais aussi la relâche de noradrénaline potentialisée par les récepteurs β présynaptiques dans les terminaisons sympathiques reliées au réseau vasculaire. L'usage de ces médicaments a

réduit les événements cardiovasculaires à l'exception de la maladie coronaire qui était toujours significativement élevée par rapport aux patients normotendus [29].

Simultanément au développement des β -bloqueurs, les bloqueurs des canaux calciques ont été développés. Ces médicaments bloquent les canaux de type L sensibles au voltage des cellules musculaires du cœur et des vaisseaux. Ils diminuent la résistance périphérique et la force de contraction du cœur, bien que la réponse du réflexe sympathique tende à éliminer l'effet inotrope négatif des produits. Cette classe de médicaments est utilisée pour ses effets hypotenseurs anti-angineux et aussi anti-arythmiques. Le vérapamil fut le premier agent développé de cette classe [30].

Suite à ces progrès, il est apparu nécessaire de développer non-seulement des composés capables de réduire la tension artérielle mais aussi de protéger plus efficacement les organes des patients à haut risque d'événements cardiovasculaires. Le système rénine-angiotensine, connu depuis plusieurs années, était une cible logique à cause de son influence sur la pression artérielle par le contrôle de la réabsorption tubulaire rénale et du volume sanguin et par les effets de l'angiotensine II sur le tonus vasculaire. Les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II empêchent l'angiotensine II d'exercer ses effets par le récepteur AT1 ce qui provoque une vasodilatation et une diminution de la production de vasopressine et d'aldostérone et diminue la pression artérielle. Les inhibiteurs de l'ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine) préviennent la formation de l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I. Ces agents développés dans les années 80 diminuent la pression artérielle efficacement et semblent poser des avantages, en

particulier sur les facteurs métaboliques tels que la tolérance au glucose ou les lipides sanguins [31].

D'autres classes ont aussi été développées bien que jusqu'à maintenant, elles sont limitées à des usages spécifiques. Les α -bloqueurs antagonisent les récepteurs α -1 adrénergiques et bloquent les effets du système sympathique sur les vaisseaux. Ils présentent cependant des effets secondaires comme une hypotension causé par l'inhibition des baroréflexes et augmentent les risques d'insuffisance cardiaque [32]. Les antagonistes des récepteurs de l'endothéline sont surtout employés dans le traitement de l'hypertension pulmonaire. La clonidine est un inhibiteur sympathique central et un agoniste α 2-adrénergique qui, par un effet de feedback, diminue la relâche de catécholamines par la médullo-surrénale. La clonidine est cependant aujourd'hui surtout utilisée contre la douleur, la dépendance aux opioïdes et l'hyperactivité.

Le *Canadian Hypertension Education Program* (CHEP) est un programme national canadien pour améliorer la détection et le traitement de l'hypertension qui émet des recommandations aux médecins Canadiens chaque année [33]. En 2006, les recommandations privilégient en première approche des changements de style de vie pour atteindre les valeurs cibles de la Société Canadienne d'Hypertension, la thérapie médicamenteuse devenant nécessaire pour des pressions diastoliques/systoliques dépassant 100/160mmHg chez des patients sans risques additionnels et 90/140mmHg chez des patients présentant des atteintes aux organes cibles ou des facteurs de risques cardiovasculaires. Chez les patients ne présentant pas d'indication spécifique souffrant

d'hypertension diastolique avec ou sans hypertension systolique, le programme recommande l'usage des diurétiques thiazides, des bêta-bloqueurs (chez les 60 ans et moins), des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II, des antagonistes du récepteur de l'angiotensine ou des bloqueurs des canaux calciques. Il est aussi souligné que l'utilisation de plusieurs classes de médicaments est souvent nécessaire pour atteindre les valeurs cibles. Des schémas de traitement plus spécifiques ont aussi été proposés dans des cas particuliers de patients hypertendus. Par exemple, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont recommandés en thérapie initiale pour les diabétiques et les insuffisants rénaux. Il est aussi recommandé d'administrer des médicaments pour protéger le système vasculaire, comme les statines ou l'aspirine, chez les patients présentant des risques cardiovasculaires multiples.

Malgré l'apparition de nouvelles cibles et thérapies, peu d'évidences montrent la supériorité d'un traitement par rapport à un autre pour le contrôle de la pression artérielle. Le bénéfice d'un traitement dépend davantage du patient et d'objectifs secondaires entre autres la glycémie, l'insulinémie, les lipoprotéines et les marqueurs de la fonction rénale. Un consensus semble cependant exister sur le besoin de diminuer la pression autant que possible précocement et de recourir à la combinaison de plusieurs classes de médicaments pour atteindre les objectifs de tension artérielle.

1.3 Le développement de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une affection des artères de gros et moyens calibres comme les artères coronaires, carotides, iliaques, fémorales et l'aorte. Elle se développe de façon asymptomatique pendant des années dans l'intima, la plus interne des trois couches artérielles, avant d'arriver à maturité. À ce stade, la lésion consiste en un épaississement focal, ou plaque, qui est formée d'un centre nécrotique constitué de cristaux de lipides et de nombreux débris cellulaires, enchâssé sous une épaisse couche de collagène. Cette capsule de collagène contient des cellules de muscles lisses ayant pour la plupart perdu leur phénotype contractile et acquis un phénotype sécréteur et aussi des leucocytes sanguins, majoritairement des monocytes-macrophages mais aussi quelques lymphocytes T et des polynucléaires, plasmocytes et monocytes. Dans le pourtour du cœur lipidique, il existe de nombreuses cellules dites spumeuses, d'origine monocyttaire, dans lesquelles il y a accumulation de vacuoles lipidiques. À la différence de la paroi artérielle normale qui n'est pas vascularisée, la plaque est irriguée par des néovaisseaux [34].

L'athérogénèse ou la maladie vasculaire ou athérosclérose fait partie intégrante du problème de l'hypertension pouvant être à la fois cause et conséquence d'une pression artérielle élevée. L'athérosclérose se développe en plusieurs étapes successives: 1) dépôts de lipides (majoritairement des LDL) sur la paroi des vaisseaux, 2) recrutement des macrophages et migration vers les couches intimes de cellules de muscles lisses vasculaires, 3) phagocytose des LDL et formation de cellules spumeuses et 4) prolifération des cellules de muscles lisses et formation de la plaque athérosclérotique. À

cette étape, la plaque entrave la circulation sanguine normale. Une diminution de la lumière du vaisseau accroît les risques de coagulation du sang et d'occlusion totale. Un bris de la plaque peut aussi déclencher la coagulation du sang par la relâche du contenu du noyau lipidique de la plaque. Une autre complication possible est un détachement de la plaque dans la circulation sanguine qui risque d'obstruer en aval un vaisseau plus petit.

1.3.1 La dyslipidémie

Les VLDL, IDL, LDL et HDL (*Very Low, Intermediate, Low et High Density Lipoproteins*) sont des lipoprotéines de transport des lipides souvent mises en cause dans la maladie vasculaire. Lors de leur absorption par l'intestin, les lipides forment des chylomicrons, particules très riches en triglycérides, qui sont transportés par le réseau lymphatique vers les récepteurs à LDL des muscles ou du foie. La lipoprotéine lipase hydrolyse les triglycérides pour leur utilisation par les tissus ou pour leur stockage par le foie. Quelques heures après un repas, le taux de chylomicrons dans la circulation diminue et le foie doit acheminer des lipides vers les tissus par la synthèse de VLDL. Sous l'effet de lipases qui hydrolysent les triglycérides des lipoprotéines, les VLDL sont convertis en IDL et en LDL riches en cholestérol estérifié. Ces lipoprotéines contiennent l'apolipoprotéine B-100 qui est reconnue par les récepteurs tissulaires du LDL [35]. Les LDL ne transportent pas uniquement du cholestérol, mais aussi une riche variété d'acides gras, dont des acides gras insaturés [36].

La relation entre un taux plasmatique élevé de LDL et le développement de l'athérosclérose est particulièrement évidente dans les cas du syndrome d'hypercholestérolémie familiale. Les patients hétérozygotes ont un gène défectif pour les récepteurs des LDL. La diminution de récepteurs effectifs à la surface des cellules n'affecte pas vraiment la quantité de cholestérol livré aux cellules, mais va favoriser l'augmentation du taux de LDL dans le plasma [37]. L'accumulation de LDL dans la circulation favorise le dépôt sur les parois vasculaires [38]. Le modèle *Watanabe* dans le lapin a été utilisé pour l'étude de cette dysfonction [39, 40]. La démonstration la plus convaincante de la relation entre cholestérolémie et mortalité coronarienne a été révélée par l'étude prospective américaine MRFIT [41]. Celle-ci a démontré que pour les patients ayant une cholestérolémie initiale de 180 à 250 mg/dl, chaque élévation de 1 mg augmente le risque de mortalité de 1,4 %. De plus, si la cholestérolémie initiale se situe à un niveau plus élevé entre 250 et 300 mg/dl, chaque élévation de 1 mg se traduit par une augmentation du risque de 2,25%.

Les récepteurs à LDL subissent l'influence de mécanismes hormonaux et environnementaux régulateurs. Les hormones de la glande thyroïdes augmentent la densité des récepteurs ce qui explique le taux peu élevé de LDL plasmatique dans les cas d'hyperthyroïdisme [42]. Le nombre de récepteurs à LDL hépatiques, un élément clé du catabolisme des LDL, diminue en réponse à une diète riche en cholestérol, bien que la majeure partie du cholestérol en circulation soit synthétisée par le foie. La compactine (mevastatine) un inhibiteur de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) est un inhibiteur compétitif de la synthèse *de novo* du cholestérol

[43]. Cet inhibiteur est le précurseur des statines, une classe de médicaments utilisés couramment dans le traitement de la dyslipidémie. Cependant, des résultats récents, en particulier dans l'étude clinique REVERSAL, montrent que l'effet bénéfique des statines sur la réduction de la plaque athérosclérotique est davantage associé à un effet anti-inflammatoire [44].

À l'opposé des LDL, les HDL ont un effet anti-athérogénique. Indépendamment du taux de LDL, une faible quantité de HDL plasmatique est associée à un risque cardiovasculaire accru. Les mécanismes exacts de l'effet protecteur des HDL ne sont pas connus bien qu'un effet antioxydant des HDL ait été suggéré [45]. Une étude comparant des habitants ruraux aux habitants urbains en Jamaïque a montré cette association entre un taux faible de HDL et un risque cardiovasculaire [46]. Le cholestérol estérifié est transporté par les HDL vers le foie pour son élimination par un processus appelé transport inverse du cholestérol (RTC). Le HDL stimule l'efflux de cholestérol des macrophages et des fibroblastes. Le cholestérol est estérifié par la lécithine et les HDL retournent vers le foie où le cholestérol est transféré par des récepteurs à LDL et éliminé dans la bile [47]. Contrairement aux LDL, les HDL ne sont pas internalisés par les hépatocytes et retournent à la circulation après s'être déchargés de leur cholestérol.

Cependant, au-delà de la simple accumulation de LDL dans la circulation, d'autres événements sont impliqués dans le dépôt de cholestérol sur les parois vasculaires. La 'perméabilisation' de l'endothélium aux lipoprotéines est influencée par l'état des cellules endothéliales. Des dommages ou une lyse des cellules endothéliales par un stress

oxydant [48, 49] ou une pression artérielle et des forces de cisaillements élevées [50] entraînent un changement ou une perte de la fonction des cellules endothéliales (dysfonction endothéliale) et serait donc un événement déclencheur majeur de l'athérosclérose. Autre événement aussi important impliquant le stress oxydant est l'oxydation des lipoprotéines et de leurs lipides associés dans la formation de dépôts ou stries lipidiques (fatty streaks) [51, 52]. Une étude dans laquelle des macrophages en culture ont été exposés à des LDL normaux ou oxydés a montré que seuls les LDL oxydés menaient à la transformation des macrophages en cellules spumeuses à pigments céroïdes typique des lésions athérosclérotiques humaines [53]. Les lipides oxydés sont d'ailleurs présumés comme étant largement responsable du recrutement initial des macrophages puisqu'une étude sur des fœtus de mères hypocholestérolémiques a montré que la formation de dépôts de cholestérol oxydé était possible avant l'intervention des macrophages [54]. L'oxydation des LDL est donc une des premières étapes du processus athérosclérotique. Une étude a cependant montré que l'augmentation de l'épaisseur intima-media de la carotide sur 3 ans chez des patients à risque cardiovasculaire faible n'a pas été ralentie par un traitement antioxydant avec la vitamine E bien que le taux de LDL électronégatifs ait diminué chez le groupe traité. Cette étude propose donc que l'oxydation des LDL ne soit pas nécessairement indispensable au développement de l'athérosclérose [55].

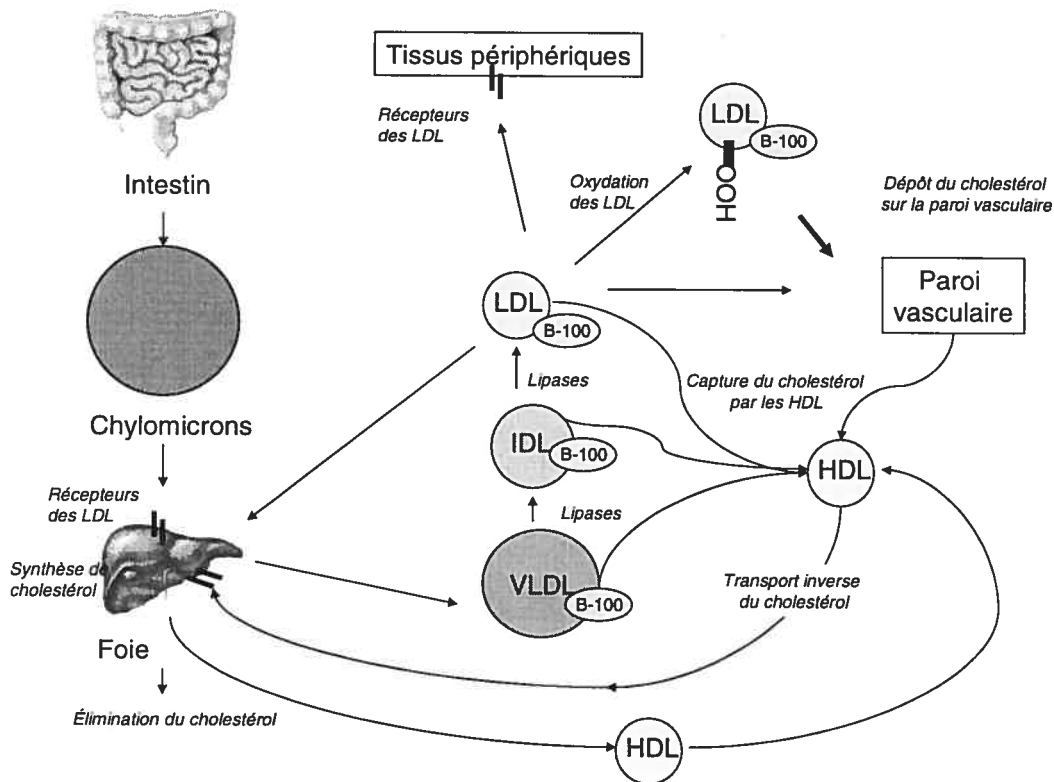


Figure 2 : Le transport du cholestérol de l'intestin aux tissus.

1.3.2 Le recrutement des cellules immunitaires

La maladie vasculaire est essentiellement une maladie inflammatoire impliquant un recrutement immunitaire. L'hypothèse générale de l'inflammation vasculaire a été originalement proposée il y a plus d'un siècle par le pathologiste Rudolph Virchow dans son célèbre ouvrage *Die Cellularpathologie* en 1858 (Cellular pathology, 1860). Le pathologiste a aussi décrit la formation d'embolies suite à un affaiblissement et un détachement du caillot de la paroi vasculaire. L'hypothèse inflammatoire a été reprise dans les années 1970 [56]. L'implication d'agents viraux externes, tels que le cytomégalo virus, l'herpes ou la bactérie *Chlamydia pneumoniae* ont même été proposés

comme étant des causes possibles d'inflammation [57]. L'inflammation aurait un impact direct sur la prolifération des cellules de muscles lisses [58]. Selon ce concept, l'athérosclérose serait un processus de guérison devenu pathologique.

L'adhérence des macrophages à l'endothélium vasculaire est un processus finement contrôlé et essentiel pour la fonction immunitaire. Une incapacité des cellules à lier l'endothélium vasculaire mène à une inflammation récurrente. Le mécanisme de liaison se sépare en deux phases impliquant d'abord des sélectines et des intégrines.

L'adhérence des macrophages sur les cellules endothéliales est un processus dynamique appelé *rolling* puisqu'en effet, les macrophages, poussés par le flux sanguin, roulent sur les cellules endothéliales. Ce roulement permet au macrophage d'interagir avec les cellules endothéliales par le biais des L-sélectines (LECAM-1, leucocyte endothelial cell adhesion molecule) constitutivement exprimées à la surface du macrophage. La L-sélectine se lie sur des hydrates de carbone glycosylés à la surface des cellules endothéliales (glyCAM et ICAM-1) [59]. Le roulement des macrophages est amplifié par plusieurs facteurs locaux sécrétés suite à une insulte locale (interleukines, $\text{TNF}\alpha$, C5a) ce qui entraîne l'expression de la E et la P-sélectine [60]. Ces nouvelles sélectines se lient aux glycoprotéines gp150 (CD15) des macrophages. Une déficience de CD15 causée par une maladie, la déficience adhésive leucocytaire de type 2, prévient le roulement des macrophages en présence d'inflammation. Une déficience en I-CAM 1, p-selectine et CD18 chez des souris transgéniques a réduit la susceptibilité des animaux à développer de l'athérosclérose [61]. Aussi, un stress oxydant comme le peroxyde d'hydrogène augmente la relâche du facteur d'adhésion plaquettaire (PAF), un facteur

vasoactif et inflammatoire qui stimule la liaison des neutrophiles sur une monocouche de cellules endothéliales humaines [62]. La migration transendothéliale est assez rapide. Le macrophage projette un pseudopode entre deux cellules endothéliales en maintenant un contact étroit avec les cellules endothéliales pour prévenir l'extravasation du sang à l'extérieur du vaisseau. Le macrophage se transfère ensuite entre la membrane basale et les cellules endothéliales. Les glycoprotéines CD 31 (PECAM-1) semblent être impliquées dans cette migration. Le passage des macrophages au travers de la membrane basale est moins bien connu, bien que l'influence de certaines protéases ait été suggérée.

L'athérosclérose et l'obstruction vasculaire sont donc le résultat d'un dérèglement du transport du cholestérol et des processus inflammatoires. Bien que ces dérèglements soient favorisés par l'hypertension artérielle et le cholestérol alimentaire, la présence de radicaux est de plus en plus proposée comme étant le facteur déclencheur majeur de la maladie athérosclérotique.

2. Physiologie et fonction du système cardio-vasculaire

Le système cardiovasculaire est un système de transport permettant les échanges nutritionnels et l'évacuation des déchets en reliant les cellules de l'organisme et les systèmes de collecte et d'excrétion. Ce système est aussi un médium d'échange hormonal et cellulaire entre différentes composantes de l'organisme et assume un rôle de transport et de régulation thermique. Le sang irrigue l'ensemble de l'organisme grâce à un réseau de tubulure, les artères, dont la taille diminue jusqu'à une épaisseur de une ou deux cellules dans les capillaires, sites des échanges entre le milieu sanguin et le milieu cellulaire. Les artères ont des structures et souvent des fonctions différentes relativement à leur taille et leur position dans l'arbre vasculaire. Le sang circule dans ces conduits par un différentiel de pression. Ce différentiel est produit par le cœur qui propulse le sang dans les artères. La pression artérielle reste relativement stable dans les gros vaisseaux de conductance, chargés de transporter le sang vers les différentes régions de l'organisme, mais la pression diminue considérablement lors de son passage dans les vaisseaux de résistance, chargés d'amortir la pression à des niveaux tolérables pour le passage dans les capillaires fragiles et ainsi permettre les échanges métaboliques. Le sang revient au cœur en passant dans un arbre vasculaire inversé de basse pression, le système veineux.

Les vaisseaux sont formés d'une couche externe (adventia) de tissu conjonctif, de collagène et de fibres élastiques. Cette couche recouvre la média composée de fibres élastiques et de cellules vasculaires de muscles lisses et la couche interne, l'intima est composée de cellules de muscles lisses et d'une couche de cellules endothéliales dans la

lumière du vaisseau. Cette composition est variable dépendamment des différents types de vaisseaux, par exemple, les artères de résistance ont une couche musculaire plus importante que les veines.

2.1 Physiologie de l'hypertension artérielle

La résistance périphérique à la circulation sanguine se situe principalement dans l'arbre vasculaire artériel. La vasoconstriction dans la microcirculation artérielle est considérée comme le facteur déterminant pour le développement de l'hypertension comparativement à la vasoconstriction dans les gros vaisseaux [63]. Cette interprétation du rôle des gros et petits vaisseaux dans la détermination de la pression systolique, diastolique ou moyenne n'est cependant pas toujours exacte puisque chez des patients souffrant d'hypertension essentielle, aucune corrélation n'a été trouvée entre l'état structurel des vaisseaux de résistance et la pression artérielle [64]. La fonction pulsatile du cœur est aussi déterminante pour l'augmentation de la pression artérielle. Le débit cardiaque, qui varie en fonction du rythme et du volume d'éjection systolique du cœur, va influencer sur la pression artérielle. Par exemple, un rythme cardiaque élevé au repos est souvent associé à l'hypertension ou à un risque de mortalité plus important à cause d'une suractivation du système sympathique [65].

Une grande partie du réseau vasculaire forme les vaisseaux de capacitance qui incluent le réseau veineux et aussi le cœur lui-même. La majorité du volume sanguin (65 à 75%) circule dans ces conduits. De légers ajustements du volume de ce bassin affectent le

retour du sang vers le cœur et le travail fourni par ce dernier (précharge). Le réseau veineux a aussi été proposé comme un contributeur possible d'hypertension [66] car bien qu'ayant une activité myogénique faible, la contraction de ses vaisseaux devient plus efficace à mesure qu'ils se remplissent [67]. Dans ses travaux, Mellander a comparé les valeurs de flux sanguin pour différentes régions au repos et à dilatation maximale des vaisseaux. Pour maintenir une pression de 100 mmHg dans le réseau vasculaire au repos, le cœur doit fournir 5 litres de sang à la minute. Cependant, pour maintenir la même pression dans un réseau dilaté à sa capacité maximale, le cœur devrait théoriquement fournir 40 litres de sang à la minute, quantité qui montre à quel point la capacité du réseau vasculaire à modifier son volume est importante [68].

Le contrôle de la pression est un phénomène essentiel à la protection et à l'alimentation des organes. Ce contrôle s'ajuste en fonction de différentes situations : besoins métaboliques locaux variables, hémorragies etc. Ce contrôle implique l'intervention de systèmes locaux ou distants, hormonaux ou nerveux et s'exerce par l'action des vaisseaux sanguins, des reins, des glandes surrénales, le cortex, le système nerveux ou l'activité métabolique.

2.1.1 Contrôle local vasculaire

L'activité métabolique est une source de produits locaux ayant des effets sur le tonus vasculaire, processus souvent désigné sous le terme 'autorégulation' [69].

L'autorégulation est un effet neuro-indépendant observé dans des organes qui ont une

augmentation de leur activité métabolique. Par exemple, la consommation d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate libère de l'adénosine laquelle, par son action sur les récepteurs à adénosine, a un effet global vasodilatateur dans les muscles squelettiques [70, 71] et surtout dans le cœur [72]. La première série de travaux sur l'autorégulation a été effectuée sur le rein où une anoxie ou un blocage nerveux n'ont pas produit de dépression du système [73]. Plus tard, un groupe a proposé que ces effets étaient causés par un autre système impliquant l'appareil juxtaglomérulaire [74].

Un autre contrôle local du tonus vasculaire réside dans la réaction des vaisseaux eux-mêmes aux variations de pression. Bayliss a proposé 'l'hypothèse myogénique' après avoir observé que la distension des vaisseaux sanguins stimule la contraction des cellules de muscles lisses vasculaires, et ce, même après dénervation [75]. Cet effet, causé par la dépolarisation spontanée des cellules vasculaires de muscle lisses, semble cependant davantage localisé dans les précapillaires et les très petits vaisseaux. Par contraste, les vaisseaux de résistance et, à un niveau moindre, les vaisseaux de conductance semblent être davantage soumis aux influences du système sympathique [76].

L'endothélium des vaisseaux sanguins est une source de plusieurs agents vasoactifs, bien que leur synthèse soit souvent influencée par des hormones qui ne sont pas produites localement. Par exemple, parmi les facteurs vasodilatateur produits par l'endothélium, on retrouve l'EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) identifié au début des années 80 [77]. Moncada et ses associés [78] ont ouvert la voie au concept de gazéotransmission en montrant que cet élément était en fait un gaz, l'oxyde nitrique (NO). Comme autres

facteurs vasodilatateurs, on retrouve les prostacyclines qui sont produites par les cyclooxygénases, des acides époxyeicosatriénoïques produits par les cytochromes p450 et les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) dont la nature exacte est peu connue et souvent confondue avec les autres facteurs hyperpolarisants produits par l'endothélium [79, 80].

L'endothélium peut aussi produire des facteurs locaux vasoconstricteurs tels que les EDCF (*endothelium-derived contracting factors*). Bien que les prostanoïdes produits par les cyclooxygénases aient été proposés comme candidats probables [81, 82], les EDCF restent indéfinis. Un autre puissant facteur vasoconstricteur, l'endothéline, est produite par l'endothélium [83] et aussi par les muscles lisses vasculaires [84]. Cette hormone augmente la relâche du calcium intracellulaire par son action sur les récepteurs de l'endothéline, en particulier le type A (voir section 2.3).

Le contrôle hormonal du flux sanguin ne suit cependant pas les mêmes règles d'une région vasculaire à l'autre. La complexité du système régulateur vient non seulement de la multiplicité des facteurs hormonaux, mais aussi du fait que les agents vasoactifs dominant varient d'un organe à un autre [85].

2.1.2 Contrôle endocrinien extrinsèque

Plusieurs systèmes hormonaux impliquent des organes qui relâchent dans la circulation des hormones capable d'affecter le système cardiovasculaire. L'un des plus importants est le système rénine-angiotensine qui produit l'angiotensine II, un vasoconstricteur et un facteur inotrope pour le cœur, à partir de composantes produites par les reins, le foie et le tissu pulmonaire (voir section 2.2). L'angiotensine II potentialise aussi l'activité d'autres systèmes hormonaux, par exemple, la vasopressine qui est produite par l'hypothalamus et qui a principalement un rôle antidiurétique. On lui attribue des propriétés vasoconstrictrices, mais comparativement à l'angiotensine II, ces propriétés sont faibles [86]. Le système rénine-angiotensine stimule la sécrétion de l'aldostérone, hormone minéralocorticoïde sécrétée par le cortex surrénalien, qui augmente la réabsorption du sodium dans les tubes contournés distaux des reins et aussi accélère le développement de la fibrose et de la rigidité vasculaire. Comme autre système hormonal on retrouve la bradykinine produite par l'activation du système kinine-kallikréine dans les vénules du système circulatoire et qui a un effet hypotenseur chez les animaux [87]. Enfin, le facteur natriurétique auriculaire (ANP), produit par les myocytes des oreillettes du cœur en réponse à une haute pression sanguine et des facteurs natriurétiques associés du cerveau (BNP) et de type C (CNP) qui augmentent la filtration glomérulaire et l'excrétion de sodium et diminuent la pression artérielle.

Les glandes surrénales sont un autre exemple de contrôle endocrinien de la pression artérielle en réponse au stress bien que ces glandes soient contrôlées par le système nerveux en grande partie. Des nerfs cholinergiques du système sympathique provoquent

la relâche d'adrénaline et de noradrénaline. Les catécholamines ont un effet inotrope positif sur le cœur par l'activation des récepteurs adrénergiques et un effet vasodilatateur dans les muscles par l'activation des récepteurs β -adrénergiques alors qu'elles produisent une intense vasoconstriction par l'activation des récepteurs α -adrénergiques.

2.1.3 Le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome est la portion du système nerveux qui n'est pas directement sous contrôle volontaire et qui est responsable des fonctions physiologiques de bases comme la digestion, la respiration et le contrôle de la pression artérielle. La pression artérielle est soumise à un contrôle du système nerveux central par le biais de réseaux nerveux périphériques et l'activité de ces réseaux, en particulier le système sympathique, joue un rôle important dans le développement et le maintien de l'hypertension [88]. L'hypertension a d'ailleurs déjà été considérée comme un problème exclusivement neural. Bien que l'activité de ces réseaux soit sous contrôle involontaire, ils peuvent être influencés par des stimuli émotionnels. La médulla oblongata [89] et l'hypothalamus [90] ont été identifiés comme des sites intervenants dans ce contrôle.

On sépare les fonctions du système nerveux autonome entre deux systèmes antagonistes, le sympathique et le parasympathique. L'activation du système sympathique se traduit par une augmentation de la contraction vasculaire et une tachycardie alors que l'activation du système parasympathique provoque une bradycardie. Les sites de contrôles de la pression artérielle et du rythme cardiaque centraux sont situés

principalement dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Les neurones du système nerveux autonome sont séparés en neurones pré et post-ganglionnaires.

Les noyaux cellulaires des nerfs pré-ganglionnaires sympathiques partent de la moelle épinière et forment des synapses cholinergiques dans les ganglions para vertébraux parallèles à la colonne vertébrale. Les nerfs post-ganglionnaires sont ensuite reliés au cœur ou aux cellules de muscles lisses par une jonction neuromusculaire dans laquelle les neurones relâchent de la noradrénaline. Dans cette jonction, des récepteurs adrénergiques de type β sur le cœur ont un effet inotropique positif et les récepteurs α -1 sur les cellules musculaires lisses entraînent une contraction musculaire par la relâche de calcium dans la cellule. Des récepteurs présynaptiques de type α -2 ont aussi été identifiés et exerceraient un rôle inhibiteur par feedback sur la relâche de noradrénaline dans l'espace synaptique [91]. Les terminaisons adrénergiques possèdent aussi des récepteurs β -adrénergiques qui, sous l'effet de l'adrénaline, augmentent la relâche de la noradrénaline. Les centres vasomoteurs émettent en continu des signaux maintenant le tonus vasculaires par le système sympathique.

L'influence du système parasympathique dans le contrôle cardiovasculaire est contrôlée par le noyau du tractus solitaire qui possède un centre de contrôle cardiovasculaire qui reçoit des signaux afférents de barorécepteurs situés au niveau de l'aorte et de l'artère carotide. L'acétylcholine est utilisée comme neurotransmetteur dans les nerfs pré et post-ganglionnaires. Le système parasympathique ralentit le rythme cardiaque par des signaux du nerf vague qui va activer des récepteurs muscariniques sur le cœur. Bien que les

signaux vasodilatateurs du système nerveux central soient plutôt mineurs comparativement aux influences vasoconstrictrices, il existe certains nerfs musculaires cholinergiques, en particulier le nerf vague, qui sont susceptibles de favoriser la vasodilatation. Cependant on leur attribue un rôle mineur dans le maintien du tonus vasculaire basal.

Les centres médullaires vasomoteurs envoient des impulsions nerveuses par les nerfs sympathiques, mais la décharge de ces impulsions peut être modifiée. Une asphyxie (hypoxie) augmente la décharge de ces neurones et par conséquent, le tonus vasculaire et la pression artérielle. À l'inverse, une diminution du taux de CO_2 dans le sang déprime l'activité des centres médullaires. Un système réflexe impliquant des chémorécepteurs et des barorécepteurs dans l'artère carotide et la crosse aortique sont aussi impliqués dans ces ajustements de pression par le CO_2 [92]. Même des systèmes hormonaux, comme l'angiotensine II, qui sont connus pour leurs effets directs sur les organes ont aussi une activité centrale. Il a été estimé que l'effet global presseur de l'angiotensine II pouvait être attribué à 50% aux effets centraux [93]. Le système rénine-angiotensine module d'ailleurs de façon importante l'activité des systèmes sympathiques et parasympathiques centraux et périphériques (figure 3). L'angiotensine II réduit l'influence du réseau nerveux vagal par un effet désensibilisant sur les barorécepteurs et au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) ce qui a pour effet d'augmenter la fréquence cardiaque. L'angiotensine II agit aussi directement sur les ganglions adrénergiques en augmentant la relâche et en diminuant la recapture d'adrénaline ce qui renforce l'effet du système sympathique sur le cœur, les vaisseaux et les reins. Le système sympathique peut

également activer le système rénine-angiotensine en augmentant la relâche de rénine au niveau des cellules juxtaglomérulaires rénales.

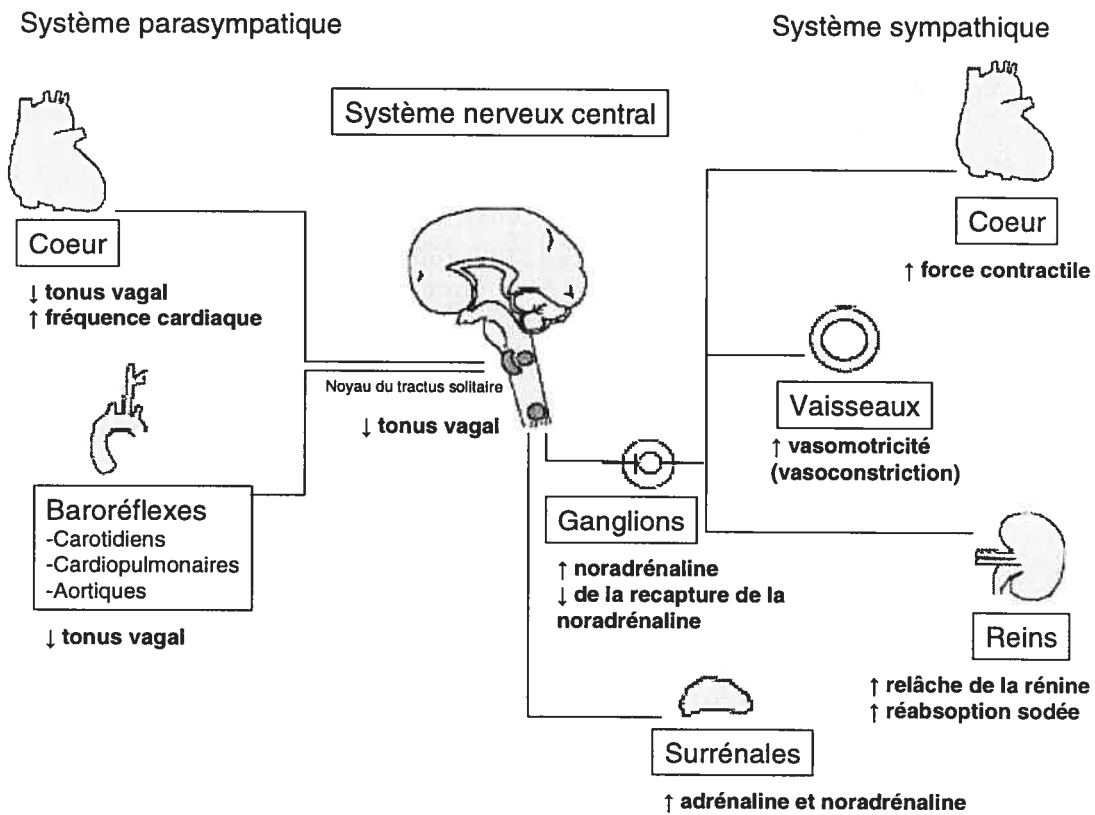


Figure 3 : Effets du système rénine-angiotensine sur le système nerveux autonome et sites potentiels d'interactions entre les deux systèmes. Inspirée de la figure de Grassi et al. [94].

2.2 Le système rénine-angiotensine (RA)

La rénine est une étape limitante dans l'activité du système RA et a été découverte par Tigerstedt et Bergman en 1898 [95] qui ont donné ce nom à une substance hypertensive et sensible à la chaleur provenant d'extraits de reins de lapins. Cette observation est passée plus ou moins inaperçue par la communauté scientifique de l'époque jusqu'à ce que l'équipe de Goldblatt ait démontré qu'une contraction des artères rénales pouvait induire une hypertension soutenue [96]. La rénine est alors proposée comme étant la cause de cette hypertension et des efforts sont ensuite déployés pour purifier cette substance [97]. L'hypertensine ou l'angiotensine, agent produit par l'action de la rénine, a été mise en évidence en 1938 par un groupe argentin [98]. Les travaux de Skeggs et al. ont finalement permis de confirmer la nature enzymatique de la rénine et d'identifier la séquence d'acides aminés du substrat et des produits, dont l'angiotensine II qui est le principal agent hypertenseur [99-102].

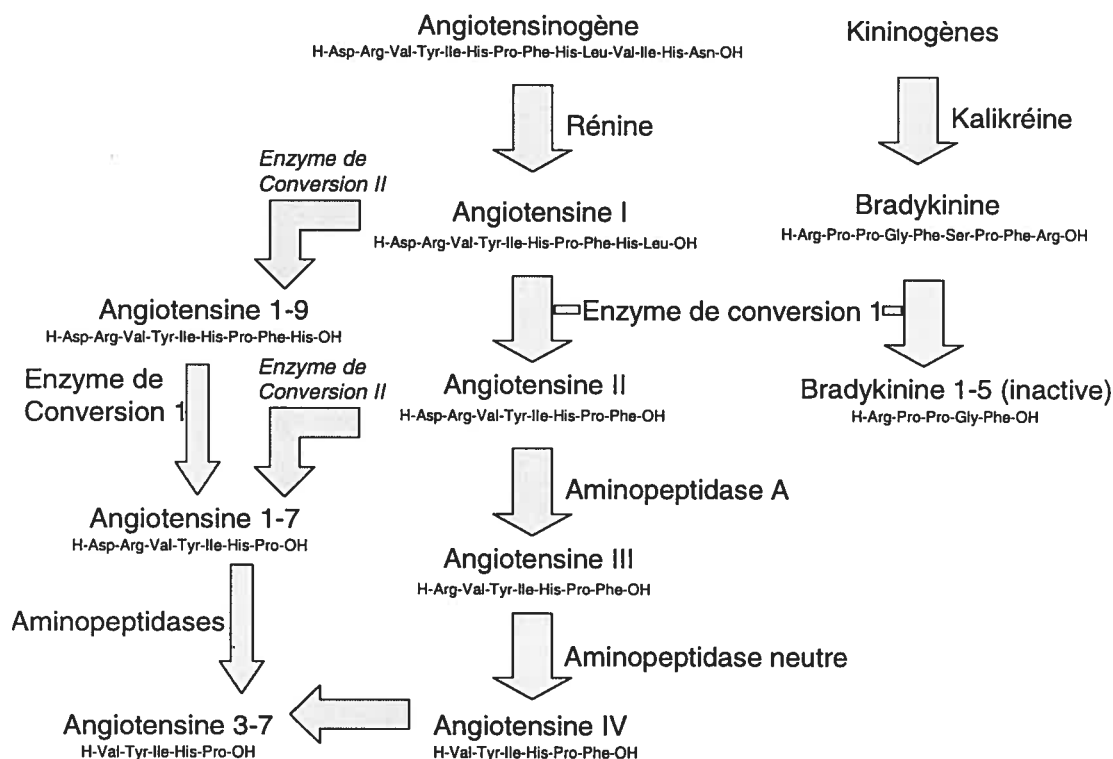


Figure 4 : Système rénine-angiotensine et interactions avec le système kinine-kalikréine.

Le système RA est un système de contrôle global et local ayant des effets aussi bien au niveau central que périphérique (figure 4). L'angiotensinogène, substrat de la rénine, est produit par le foie et sécrété dans le plasma [103]. La rénine coupe le lien leucine-valine de l'angiotensinogène pour former l'angiotensine I. Elle est produite et relâchée dans la circulation par les cellules juxtaglomérulaires du rein en réponse à une chute de pression ou une diminution de la concentration de sel [104]. Les nerf sympathiques, reliant les cellules vasculaires de muscles lisses juxtaglomérulaires, sont aussi importants dans la modulation de la relâche de la rénine [105]. L'angiotensine I est ensuite clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en angiotensine II. L'ECA est une enzyme carboxypeptidase hydrophobe liée aux cellules endothéliales vasculaires

particulièrement concentrée au niveau de la circulation pulmonaire [106]. L'angiotensine II est rapidement dégradée en angiotensine III par l'aminopeptidase A de la circulation sanguine. Cette nouvelle molécule est considérablement moins active que l'angiotensine II, cependant elle possède, comme l'angiotensine II, la capacité d'inhiber la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires et la capacité de stimuler la sécrétion d'aldostérone, un minéralo-corticostéroïde, produit par les glandes surrénales. Une voie alternative impliquant une autre ECA (ECA2) a récemment été découverte. L'ECA2 mène à la formation de l'angiotensine 1-7 qui a des propriétés vasodilatatrices. La compétition entre les deux ECA a été proposé comme un mécanisme régulateur important de la fonction cardiaque [107].

Le système rénine-angiotensine est aussi étroitement associé à la bradykinine, puissant vasodilatateur dépendant de l'endothélium produit par le système kinine-kallikréine. Le système kinine-kallikréine est composé de kininogènes (haut et bas poids moléculaires) et de la kallikréine, une enzyme libérant les kinines des kininogènes. Ces composantes sont synthétisées par le foie, mais aussi localement par les tissus. La bradykinine est dégradée par l'ECA, par la carboxypeptidase N et par l'aminopeptidase C [108]. Selon une étude, les deux tiers de la dégradation de la bradykinine dans le sérum ou le plasma humain est causée par l'activité de l'ECA [109]. Cet effet de l'ECA a donc un impact physiologique significatif puisque la potentialisation des effets des kinines contribue aux actions cardioprotectrices des inhibiteurs de l'ECA [110].

Des systèmes RA extra-rénaux capables de produire la rénine et l'angiotensinogène en quantités locales égales ou supérieures au système rénal et hépatique ont aussi été identifiés dans le cerveau, la paroi artérielle et les glandes adrénargiques [111, 112] confirmant l'existence de plusieurs systèmes locaux indépendants.

Il a été montré que l'angiotensine II pouvait produire une hypertension soutenue [113]. Cependant, même des doses d'angiotensine II originellement trop faibles pour produire un effet presseur aigu, vont induire une augmentation progressive lente de la pression lorsqu'administrées chroniquement [114]. Ces observations permettent de supposer que l'angiotensine II possède des mécanismes d'actions variés au-delà d'un simple effet vasoconstricteur.

2.2.1 Signalisation de l'angiotensine II

La signalisation de l'angiotensine est contrôlée par deux récepteurs principaux, le récepteur AT1 et AT2 et trois autres dont les fonctions sont mal connues (AT3, AT4 et AT5). Le récepteur AT1 est un récepteur couplé aux protéines G possédant sept domaines transmembranaires [115]. Sa voie de signalisation principale est couplée à la liaison et phosphorylation de la protéine Gq/11 qui active la phospholipase C- β . La phospholipase produit deux seconds messagers à partir du phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2), l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). L'IP3 active la relâche de calcium à partir des stocks intracellulaires et le DAG active la protéine kinase C (PKC). D'autres interactions avec des protéines Gi1, Gi2 et Go ont

aussi été rapportées, mais leur rôle n'a pas été identifié [116]. L'effet aigu vasoconstricteur de l'angiotensine II est expliqué par cette relâche de calcium intracellulaire qui amorce la dépolarisation et la contraction des cellules vasculaires de muscles lisses. L'effet d'une augmentation de l'activité PKC est cependant plus complexe et est associé aux effets à long terme de l'angiotensine II, particulièrement à ses effets dépendants des voies tyrosines kinases. Les récepteurs AT1 activent des voies tyrosines kinases telles que Src, Fyn, Pyk2, jak2/STAT [117] soit par des interactions directes [118] ou par des effets de la protéine Gq ou PKC [119]. Les récepteurs AT1 peuvent aussi activer directement par transactivation la phosphorylation des récepteurs de facteurs de croissances endothéliaux [120]. La signalisation du récepteur AT1 converge donc avec celles des récepteurs des facteurs de croissance ce qui explique ses effets prolifératifs observés dans plusieurs types cellulaires du système cardiovasculaire (figure 5).

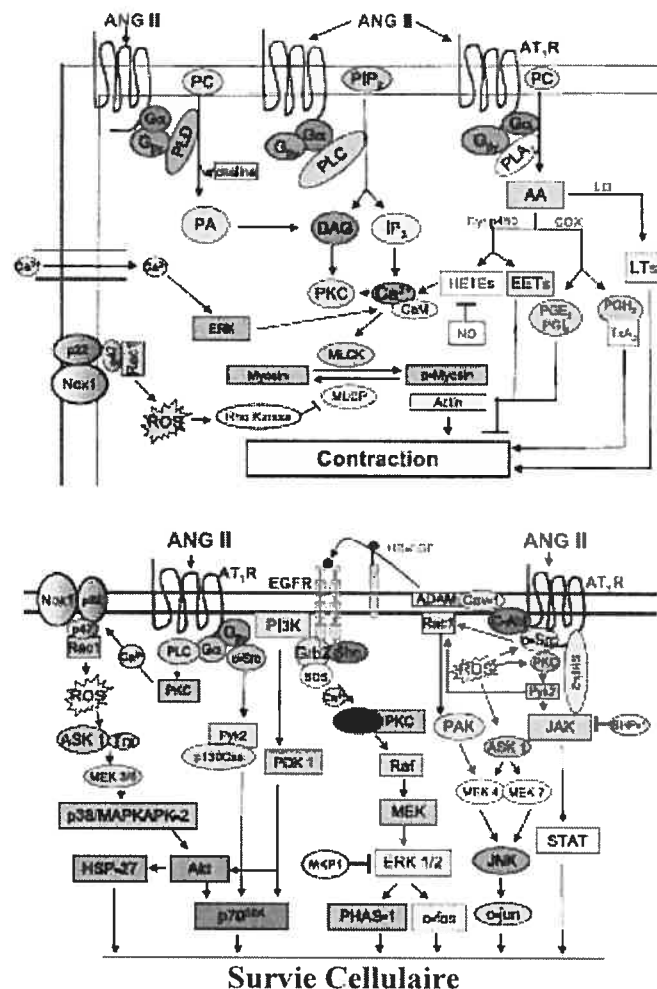


Figure 5 : Signalisation du récepteur AT1 de l'angiotensine II dans les cellules de muscles lisses vasculaires. L'angiotensine II active des voies de signalisation importantes pour la contraction musculaire des cellules, mais aussi pour la survie, la prolifération et l'hypertrophie cellulaire. Légende : PC, phosphatidylcholine; PLD, phospholipase D; PA, acide phosphatidique; PIP2, phosphatidylinositol bisphosphate; PLC, phospholipase C; PKC, protéine kinase C; DAG, diacylglycérol; IP3, inositol trisphosphate; MLCK, kinase de la chaîne légère de myosine; PLA2, phospholipase A2; PG, prostaglandines; EET, acide epoxyeicosatriénoïque; HETE, acide hydroxyeicosatétraénoïque; COX, cyclooxygénase; LT, leukotriènes; LO, lipoxygénases; TxA2, thromboxane A2; NO, oxyde nitrique; ADAM, activation des disintégrines et des metalloprotéinases; JAK, Janus kinase; EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermal; HB-EGF, facteur de croissance epidermal liant l'héparine; ASK, kinase régulant le signal apoptotique (*apoptosis signal-regulating kinase*); Trx, thioredoxine; ROS, espèces réactives dérivant de l'oxygène; HSP, protéines de choc thermique; JNK, kinase NH2-terminale de c-Jun; Cav-1, cavéoline-1; PKC, protéine kinase C; MKP-1, MAP kinase phosphatase-1; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PDK-1,3, kinase dépendante des phosphoinositides-1.

Schémas tirés de *Am J Physiol Cell Physiol* 292:82-97, 2007. [121].

Le récepteur AT2 est également un récepteur couplé aux protéines G possédant sept domaines transmembranaires [115]. Il est couplé principalement et presque exclusivement aux protéines Gi [122]. L'activité du récepteur AT2 est généralement opposée à celle de l'AT1 et entraîne une ouverture des canaux potassiques [122] des cellules de muscles lisses ce qui induit une vasodilatation et favorise aussi l'apoptose [123]. Généralement, l'expression et l'activité du récepteur AT2 sont masquées par celles du récepteur AT1 de sorte que l'un des effets positifs des antagonistes de l'AT1 utilisés pour le traitement des maladies cardiovasculaires serait la mise en valeur des effets des récepteurs AT2 [124].

2.4 L'endothéline

L'endothéline est un peptide de 21 acides aminés principalement produit par les cellules endothéliales qui a été isolé et purifié en 1988 [83] bien que des études aient montré l'existence d'une substance vasoconstrictrice produite par les cellules endothéliales quelques années auparavant [125]. L'infusion d'endothéline dans la circulation provoque une vasoconstriction et une augmentation soutenue de la pression artérielle [83].

L'analyse génétique de l'endothéline a permis d'identifier trois types (1, 2 et 3) ayant la même taille et provenant de différents gènes. L'expression des endothélines varie d'un tissu à l'autre bien que l'endothéline-1 soit prédominante au niveau des vaisseaux [126]. Les trois endothélines ont toutes des effets vasoconstricteurs et proviennent de trois précurseurs différents (pré-pro-endothélines 1, 2 et 3 et pro-endothélines 1, 2 et 3).

La synthèse de l'endothéline est divisée en plusieurs étapes. D'abord la synthèse de pré-pro-endothéline est reliée à l'activation du complexe de transcription AP-1, assemblé en réponse à des stimuli tels que les voies MAPK. La pré-pro-endothéline est ensuite convertie en pro-endothéline et en 'big-endothéline' par l'effet d'une protéase et d'une convertase et ensuite, par l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), la 'big-endothéline' est convertie en endothéline [127]. Il existe 3 familles d'isoformes des ECE, mais les ECE1 sont les plus répandues et les mieux connues. Deux voies intermédiaires impliquant une enzyme chymase et métalloprotéinase peuvent convertir la 'big'-endothéline en endothéline1-31 et 1-32 respectivement (figure 6). Ces deux formes possèdent, comme l'endothéline-1, des propriétés vasoconstrictrices et seraient surtout impliquées dans des situations pathologiques [128]. L'angiotensine II, les radicaux libres, les forces de cisaillement et la thrombine stimulent la relâche d'endothéline au niveau des vaisseaux alors que l'oxyde nitrique, les facteurs natriurétiques de l'oreillette et du cerveau et les prostacyclines ont plutôt une influence inhibitrice sur la relâche des précurseurs de l'endothéline [129].

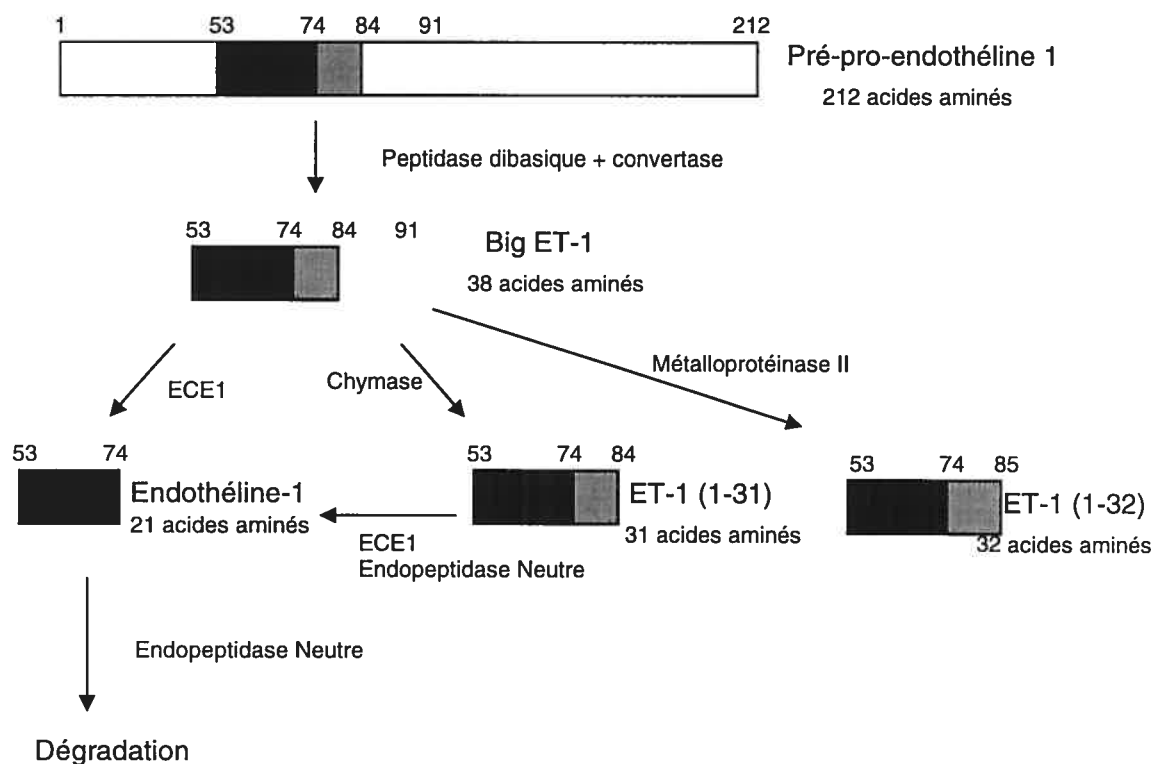


Figure 6 : Synthèse de l'endothéline chez l'humain. Figure tirée de l'article de Orlean-Juste et al. [128] avec modifications.

Deux récepteurs de l'endothéline ont été clonés (ETA et ETB) [130, 131]. Ces récepteurs ETA et ETB font partie de la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Les effets vasoconstricteurs de l'endothéline sur les tissus vasculaires sont cependant principalement contrôlés par l'activation des récepteurs ETA qui augmentent la concentration du calcium intracellulaire par l'activation de la phospholipase C par une activation des protéines Gq [132]. Les récepteurs ETA sont présents en plus forte concentration dans la plupart des tissus cardiovasculaires, surtout dans les artères, bien que les récepteurs ETB soient présents en quantité appréciable dans les veines et le réseau artériel pulmonaire à la

surface des cellules endothéliales et musculaires lisses [133, 134]. À l'opposé des récepteurs ETA, les récepteurs ETB ont une influence vasodilatatrice en augmentant la synthèse du NO et des prostacyclines [135]. L'administration d'un antagoniste des récepteurs ETA, le BQ-123, a amélioré les réponses vasodilatatrices chez des patients alors que l'administration d'un antagoniste ETB, le BQ-788, a induit une vasoconstriction dans les artères de résistance des avant-bras chez l'homme [136].

En plus de ses effets vasoconstricteurs, l'endothéline a été associée à des effets vasodilatateurs régionaux [137], à la prolifération des cellules de muscles lisses vasculaires [138], à des effets inotropes positifs sur le myocarde [139], à l'augmentation de la relâche du facteur auriculaire natriurétique (ANP) et à la modulation de la relâche de noradrénaline des terminaisons sympathiques [140]. Bien que les effets et la signalisation de l'endothéline-1 partagent des analogies avec l'angiotensine II, l'endothéline est davantage un facteur local en opposition au rôle plus global de l'angiotensine. Les étapes de la synthèse sont localisées aux sites d'action et la stabilité et la concentration dans la circulation sont plus faibles comparativement à l'angiotensine II [141]. Il est à noter que d'autres types cellulaires, incluant les cellules vasculaires de muscles lisses (CVML) et les cardiomyocytes peuvent produire ce peptide [84] ce qui implique l'existence de systèmes locaux de synthèse dans les tissus.

La stimulation de cellules endothéliales par l'angiotensine II augmente la synthèse de l'ARN de la pré-pro-endothéline [142]. Dans les artères de résistance mésentériques, une stimulation prolongée par l'angiotensine de 5 heures potentialise la contraction induite

par la noradrénaline alors qu'un traitement de 1 heure à l'angiotensine n'a pas d'effet. Cette potentialisation a été prévenue par un anticorps contre l'endothéline et les cellules endothéliales prélevées sur le système ont une expression de l'ARN de la pré-pro-endothéline augmentée [143]. De plus, il a été observé que le traitement avec un antagonisme des récepteurs AT1 a diminué la production d'endothéline dans les glomérules rénaux [144]. Il semble donc exister une relation étroite entre les deux systèmes, particulièrement en ce qui a trait aux effets chroniques du système rénine-angiotensine.

3. La voie ERK-MAPK

Les protéines ERK1 et 2 ont été identifiées par Boulton et al. en 1991 [145]. Ces deux protéines sont ubiquitairement exprimées dans les tissus et sont phosphorylées sur des tyrosines lorsque activées. ERK2 est légèrement plus petite et 85% homologue à ERK1 [145]. La participation de l'entité de la ERK-MAPK (*extracellular regulated kinase-mitogen activated protein kinase*) dans diverses voies de signalisation a par contre été détaillée graduellement. En 1980, des travaux ont montré que le récepteur du facteur de croissance endothélial possédait une activité tyrosine kinase [146]. D'autres récepteurs à activité tyrosine ont été ensuite décrits par exemple : les récepteurs à insuline [147], le récepteur du facteur de croissance plaquettaire [148], le récepteur du facteur de croissance des nerfs [149] et les antigènes CD4 CD8 [150].

Le schéma classique de la voie ERK-MAPK implique une activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase. Cette vision linéaire de la voie ERK-MAPK a du être nuancée par la suite, puisqu'un nombre important de voies parallèles et alternatives reliées à la voie ERK-MAPK a pu être démontré. ERK est donc devenu au cours des découvertes, un véritable carrefour de signalisation.

Les tyrosines phosphorylées sur le récepteur offrent un site d'ancrage pour la protéine adaptatrice Grb2/Sem-5 [151] qui par la suite forme un complexe avec la protéine Sos [152]. Sos active une protéine G ras en échangeant le GDP pour du GTP sur ras et ras lie raf, une sérine thréonine kinase. Le complexe de signalisation est temporaire, mais permet à raf de phosphoryler sur deux sérines (la 218 et 222) sur une protéine

cytoplasmique appelée MEK. MEK est présente sous deux isoformes et phosphoryle les protéines ERK1 et 2 sur la thréonine 183 et la tyrosine 185 [153]. La fonction kinase de la protéine ERK est alors amplifiée de plus de mille fois. Les cibles principales de ERK peuvent être cytoplasmiques comme la p90 ribosomale S6 kinase (Rsk) et la phospholipase A₂ ou peuvent être nucléaires comme elk-1 et c-jun [154] (figure 7).

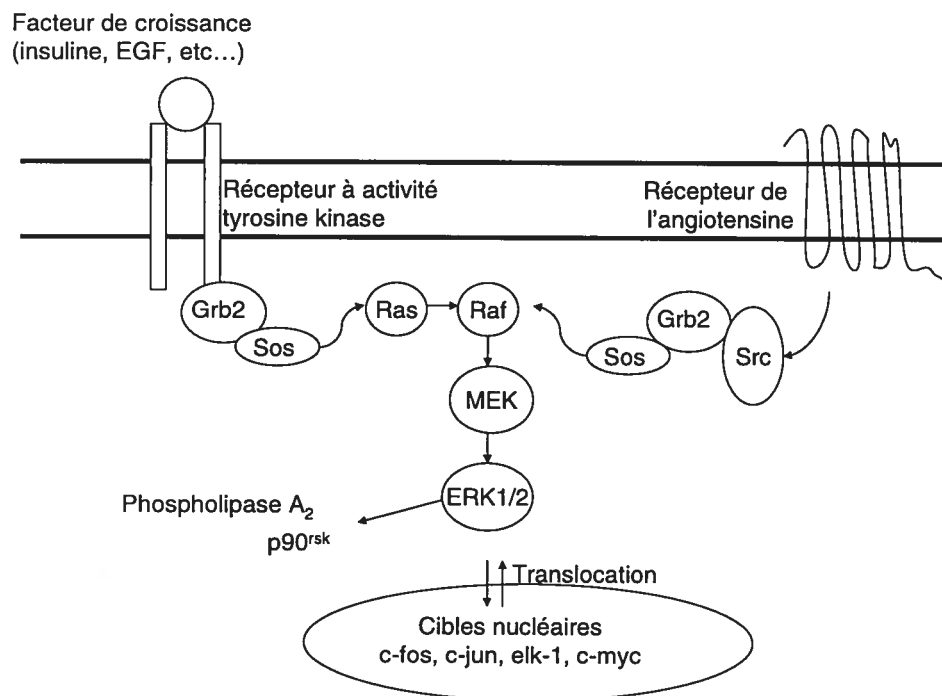


Figure 7 : Stimulation de la voie ERK-MAPK par des facteurs de croissance ou par l'angiotensine II

Récemment, une autre forme de ERK a été clonée et présente une certaine homologie (~50%) avec les ERK 1 et 2. Cette ERK3 ne phosphoryle cependant pas les substrats classiques de ERK1/2 [155]. La fonction est relativement peu connue. Il a été proposé que ERK3 jouerait un rôle dans la synthèse de l'insuline [156]. Un autre membre

récemment découvert de cette famille est la ERK5 qui possède une activité kinase basale très élevée et est exprimée dans les tissus cardiovasculaires [157]. ERK5 a été proposée comme une protéine réagissant fortement au stress oxydant et phosphorylant le facteur de transcription SAP1a et les facteurs de transcription des myocytes 2A et C [158].

Deux autres voies de la famille des MAPK ont aussi été bien décrites, la voie p38 et la voie *c-jun n-terminal kinase* (JNK). Ces voies sont activées en réponse à des stress tels que des stimuli inflammatoires (cytokines), un choc osmotique ou un choc thermique. Ces voies ont souvent été associées à l'apoptose des cardiomyocytes, la production de radicaux et au développement de l'insuffisance cardiaque [159, 159, 159-161].

3.1 Une alternative aux récepteurs à activité tyrosine kinase : les Src

Les Src sont des protéines cytoplasmiques qui ont des caractéristiques communes avec les récepteurs à activité tyrosine kinase. Les Src (pour sarcoma) ont d'abord été identifiées comme des produits de cellules transformées par le virus du sarcome aviaire [162]. Les Src possèdent des domaines SH2 et SH3 qui sont phosphorylables et forment les sites d'ancrage pour la Grb2 et possède aussi une activité tyrosine kinase. L'activation des protéines Src a été reliée à plusieurs processus cellulaires tels que la réorganisation du cytosquelette, la différenciation cellulaire, la sécrétion hormonale, la régulation des canaux ioniques et la prolifération cellulaire [163]. Les Src remplacent les récepteurs à tyrosine kinases pour former le complexe Grb2/Sem-5/Sos et permettent d'activer la voie ERK-MAPK par le biais de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux

protéines G [164] comme les récepteurs aux opioïdes [165] ou les récepteurs à l'angiotensine [166].

3.2 Les rôles de la voie ERK-MAPK

La protéine ERK phosphorylée a une activité kinase qui cible plusieurs protéines du cytoplasme et du noyau cellulaire. Bien que beaucoup de ces réactions de phosphorylation soient décrites dans la littérature, la complexité de la biologie moléculaire associée à ERK rend difficile l'identification des fonctions de la voie sur les seules données moléculaires. Une approche générale consiste à affirmer que la voie ERK-MAPK contrôle la prolifération cellulaire à cause de l'activation de facteurs de transcription reliés au cycle cellulaire et aux effets anti-apoptotiques de la voie qui sont opposés aux effets des voies p38 et JNK [167]. Au-delà d'un simple maintien de la survie des cellules, une suractivation de la voie ERK-MAPK a été associée à différentes pathologies du système cardiovasculaire.

3.3 La voie ERK-MAPK et la maladie cardiovasculaire

La suractivation et l'implication de la voie ERK-MAPK dans le développement des maladies cardiovasculaires ont été rapportées dans différents organes. L'activité de cette voie a été associée avec des hormones telles que l'angiotensine II [168] et est en majeure partie responsable des effets physiologiques de l'hormone, en particulier les effets trophiques, mais aussi les effets contractiles sur le système vasculaire [169].

Des hypothèses sur le rôle de la voie ERK-MAPK dans le contrôle du tonus vasculaire ont été proposées en particulier sur son rôle dans la relâche de molécules vasoactives par les cellules endothéliales artérielles exposées à des forces de cisaillement [164].

Cependant, une majorité d'études sur le sujet proposent une influence plutôt vasoconstrictrice de la voie. L'inhibition des voies tyrosine kinase a eu un effet vasodilatateur sur des vaisseaux traités à la phényléphrine et la nitroglycérine [170]. Des conclusions similaires ont été proposées dans des artères de résistances où une inhibition des ERK-MAPK prévient la contraction des vaisseaux isolés [171]. Dans la zone médullaire rostrale ventrolatérale, un site d'action de l'angiotensine II sur les neurones du système sympathique, l'effet presseur de l'angiotensine II est relié à la production de l'anion superoxyde par la NAD(P)H oxydase et à l'activation des voies ERK-MAPK et p38 [172].

Certaines études ont évalué l'effet global d'inhibiteurs de la voie ERK-MAPK sur la pression artérielle dans différents modèles expérimentaux d'hypertension. En effet, il a été démontré que la voie ERK-MAPK contribue à une pression artérielle élevée chez des rats hypertendus DOCA-sel [173] puisqu'un traitement aigu avec un inhibiteur des ERK-MAPK injecté directement dans la circulation a diminué la pression artérielle *in vivo* chez ces animaux [174]. Cet effet n'est cependant pas nécessairement d'origine vasculaire, mais pourrait aussi dépendre d'une action sur le système nerveux central.

En plus de l'effet presseur, l'activité ERK-MAPK est aussi associée au remodelage, à l'hypertrophie ou aux dommages subis par les organes du système circulatoire. En particulier, l'association de la voie ERK-MAPK avec des processus de croissance cellulaire fait en sorte que la voie est souvent associée aux processus hypertrophiques cardiaques en particulier suite à la stimulation des cardiomyocytes par l'angiotensine II [175]. Dans les fibroblastes cardiaques, les voies ERK et p38 MAPK sont responsables de l'induction de la production de l'interleukine-6 par la production de radicaux stimulés par l'angiotensine II [159, 176]. Dans un modèle de rat partiellement nephrectomisé, l'activité ERK-MAPK est augmentée et associée au développement de l'hypertrophie cardiaque par l'angiotensine II alors que les autres MAPK ne sont pas activées [177]. Un ARN antisens contre les récepteurs du facteur de croissance endothélial prévient le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche par le biais de la voie ERK-MAPK chez les rats SHR [178] et chez des rats infusés à l'angiotensine II [179]. Un effet préventif des statines, indépendant de l'augmentation de la pression artérielle, sur le développement de l'hypertrophie cardiaque chez le rat a notamment été attribué à une inhibition des ERK-MAPK [180]. Suivant le développement de l'hypertrophie cardiaque, l'activité ERK-MAPK a été augmentée de façon continue dans le tissu cardiaque de rats avec une coarctation aortique pendant 8 semaines. Il a donc été proposé que la voie ERK-MAPK pourrait jouer un rôle clé dans la transition entre un état compensatoire hypertrophique et l'insuffisance cardiaque [181].

Le remodelage vasculaire et l'athérosclérose sont aussi des phénomènes qui mettent en jeu la prolifération cellulaire et l'activité de la voie ERK-MAPK. L'augmentation de la

synthèse protéique induite par l'angiotensine II dans les artères de résistance et conductance est associée à une augmentation de l'activité de la voie ERK-MAPK particulièrement dans l'aorte [182]. La voie ERK-MAPK serait aussi augmentée et accompagnerait une synthèse protéique accrue lors de l'inhibition de la NO synthase dans l'aorte de rats Sprague-Dawley [183]. L'induction de la fibrose vasculaire et de la synthèse de collagène par l'endothéline dans l'aorte de souris a été prévenue par le blocage de la voie ERK-MAPK [184].

Finalement, d'autres types de lésions causées aux organes ont été décrites comme le résultat de l'activité ERK-MAPK, en particulier pour les reins. La néphropathie causée par un traitement à l'aldostérone a été associée à une suractivation de la voie ERK-MAPK [185]. La voie ERK-MAPK est impliquée dans la néphropathie diabétique chez le rat Wistar [186]. Le blocage de la voie ERK-MAPK dans des rats Ren2 (haute rénine) prévient les dommages rénaux associés à ce modèle [187].

Malgré le nombre d'études associant la suractivation de la voie ERK-MAPK avec les altérations pathologiques causées par les maladies cardiovasculaires, l'inhibition de la voie ERK-MAPK n'a jamais fait l'objet d'études en clinique sur le système cardiovasculaire. On suppose à tort ou à raison que l'inhibition d'une voie ayant un rôle majeur sur les signaux de croissance cellulaire serait la cause d'effets secondaires majeurs, bien que ces effets n'aient jamais été encore répertoriés. La seule exception serait le PD184352, un inhibiteur de la voie ERK-MAPK, qui est présentement à l'étude comme anticancéreux dans une étude clinique [188].

4. Le stress oxydant ou les radicaux

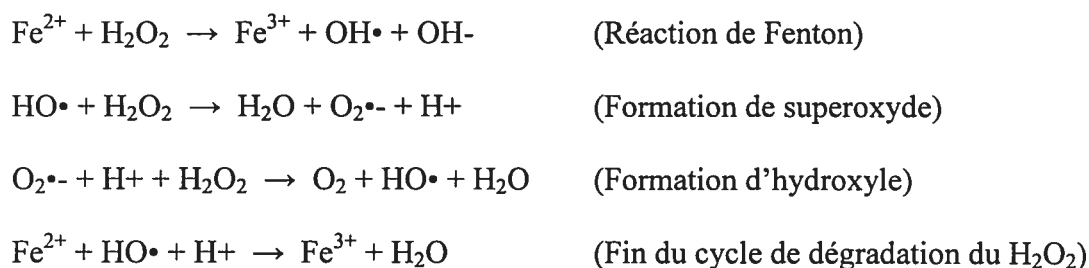
Le terme radical provient des mots radix ou radicalis qui signifient 'relatif aux racines'.

Les premières utilisations du terme en chimie remontent jusqu'en 1787 dans l'ouvrage *La nouvelle nomenclature chimique* de Gyton de Morveau. Lavoisier donne d'ailleurs une définition du *radical* et des *radicaux composés* dans *Le traité élémentaire de chimie* paru en 1789. Les radicaux étant des groupements chimiques qui sont conservés d'une réaction à l'autre comme le radical fluorique ou le radical nitrique [189]. Les radicaux étaient en fait des fonctions chimiques et plusieurs de ces fonctions ont été identifiées au cours du 19^e siècle [190].

Moses Gomberg découvre en 1900 le premier radical libre à partir du chlorure de triphényl méthyle [191]. Le radical tryphénylméthyle avec un électron non-pairé reste stable en présence de gaz rares. Gomberg a donc proposé que le carbone puisse être un élément trivalent sous certaines conditions. Les travaux de Fenton au début du siècle sont une étape importante dans le développement de la chimie radicalaire [192]. La réaction de Fenton est toujours une référence pour décrire la formation de l'anion hydroxyle catalysée par le fer à partir du peroxyde d'hydrogène :



Fenton n'a cependant pas vraiment approfondi les mécanismes sous-jacents à cette réaction. Une proposition mécanistique pour expliquer la réaction de Fenton a été proposé au début des années trente et du même coup, le radical hydroxyle a été mis en évidence [193]. Le cycle de Haber-Weiss est par la suite décrit [194] :



La chimie radicalaire reste cependant un domaine concernant surtout l'industrie cosmétique ou chimique, bien qu'en 1962, une hypothèse intéressante est émise sur le rôle des radicaux libres qui, en causant des dommages sur les biomolécules, en particulier l'ADN, seraient responsables des déficiences génétiques associées au vieillissement [195].

Le cycle de Haber-Weiss est récupéré en 1970 pour expliquer les effets toxiques de l'anion superoxyde sur le matériel vivant [196]. Finalement, la découverte de l'EDRF [78], qui est un radical sur l'azote a probablement donné le véritable départ de la biochimie des radicaux qui a connu au cours des années suivantes un progrès rapide. L'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) recommande d'utiliser le terme 'radical' pour désigner des molécules avec des électrons libres et le terme 'groupe substituant' pour des groupes chimiques conservés entre les réactions (ex. : SO_4^{2-}). Le 'radical libre' est donc dépassé, bien qu'encore couramment utilisé [197].

4.1 Les principales espèces oxydantes dans les systèmes biologiques

Les effets nocifs des radicaux étaient d'abord attribués à leur capacité à réagir de façon indiscriminée avec des molécules biologiques. Les dommages causés aux molécules de

différents systèmes, par exemple l'ADN, ont été reliés à des causes possibles de cancers [195].

Un aspect insidieux des espèces réactives est qu'en réagissant avec d'autres molécules pour atteindre une conformation électronique plus stable, il y a formation de nouveaux radicaux. Ce processus se poursuit jusqu'à ce que deux radicaux se rencontrent pour former un lien covalent et ainsi stopper la réaction. Par exemple, la superoxyde dismutase (SOD) une enzyme faisant partie de la défense anti-oxydante de l'organisme, va forcer deux anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) à réagir entre eux pour former du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène.

Le rôle fonctionnel joué par les radicaux dans l'organisme est bien souligné par l'existence de maladies génétiques reliées à des déficiences d'enzymes de production d'espèces radicalaires. Par exemple, dans le cas de la maladie chronique granulomateuse [198], une mutation d'une sous-unité de la NAD(P)H oxydase sur le chromosome X diminue la production d'anion superoxyde dans les macrophages et réduit leur efficacité à détruire des bactéries. Un traitement par thérapie génique en insérant une copie fonctionnelle du gène de la NAD(P)H oxydase rétablit cette anomalie [199].

Bien que dans le cas du système immunitaire, le rôle fonctionnel des radicaux est bien établi, la preuve définitive reste toujours à établir dans les autres tissus, en particulier les tissus du système cardiovasculaire. Évidemment, les propriétés signalisatrices et l'ensemble des systèmes affectant le stress oxydant laisse penser que la présence de radicaux dans les tissus cardiovasculaires est beaucoup plus qu'un simple accident ou

conséquence du milieu aérobique dans lequel nous vivons. Compte tenu du présumé rôle des radicaux libres dans le fonctionnement de l'organisme il est surprenant que peu ou pas d'effet secondaires n'aient été rapportés suite à l'utilisation de thérapies anti-oxydantes. On peut supposer que la production de radicaux libres est trop abondante ou que les agents anti-oxydants n'atteignent pas complètement les sites de production des radicaux libres pour entraver leurs rôles 'naturels'. Il est à souligner que certains effets des vitamines A et E et le bêta-carotène sur les risques de développement du cancer sont assez controversés. Par exemple, l'étude *the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial*, qui comprenait 18 000 personnes à risque de développer un cancer du poumon a montré que les patients traités avec une combinaison bêta-carotène et vitamine A ont un plus haut taux de mortalité attribuable aux maladies cardiovasculaires et au cancer du poumon comparativement aux patients traités avec un placebo [200]. Il reste que ces résultats ne sont pas uniformes d'une étude à l'autre, qu'il est possible que cet effet soit limité aux vitamines, qui sont des antioxydants souvent discutables, et qu'une diminution directe des radicaux ou de leurs marqueurs produits dans l'organisme des patients traités n'a jamais été associée avec ces augmentations de risque.

4.1.1 L'anion superoxyde

L'anion superoxyde est un radical formé d'une molécule d'oxygène avec un électron supplémentaire libre O_2^- et est une des formes principales de stress oxydant dans l'organisme vivant. Une description fondamentale de la formation de l'anion superoxyde

a été décrite par Haber et Willstätter [193]. L'équipe de Fridovich est par contre la première à souligner la toxicité in vivo de ce radical [196, 201].

L'anion superoxyde a une durée de vie relativement courte et est converti assez rapidement en différents produits (figure 8), entre autres le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle qui est un des radicaux les plus réactifs que l'on retrouve dans les cellules vivantes et est capable de réagir avec n'importe quelle molécule particulièrement les lipides [202]. De plus, l'anion superoxyde peut réagir avec le monoxyde d'azote pour former du peroxynitrite qui est un puissant agent oxydant [203]. D'ailleurs, cet effet de l'anion superoxyde contribue de façon majeure au développement de la dysfonction endothéliale [204]. Un autre effet toxique du superoxyde est relié à sa capacité d'inactiver les noyaux fer-soufre d'enzymes ce qui a pour effet de libérer du fer libre dans la cellule [205]. Le fer libre favorise la formation du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène. Il est également toxique pour la cellule et peut même causer des dommages oxydatifs sans l'intervention du peroxyde, du radical hydroxyle ou de l'anion superoxyde [206].

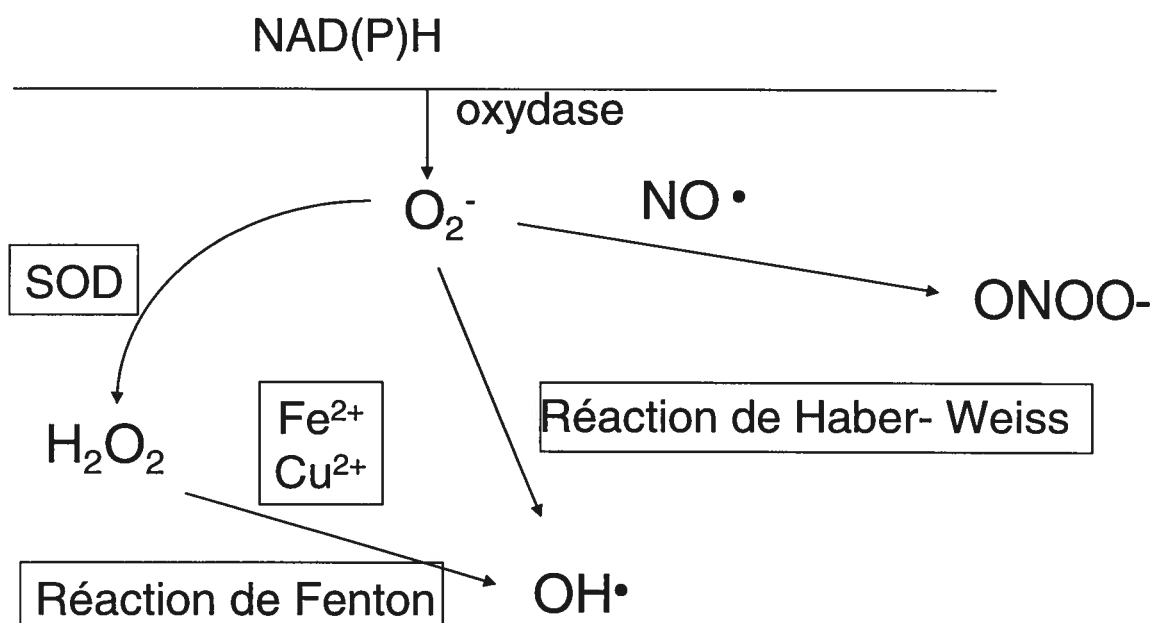


Figure 8 : Les réactions et les produits de l'anion superoxyde.

L'anion superoxyde est produit en grande quantité par les phagocytes pour tuer les pathogènes invasifs [207]. Il est produit aussi en quantité plus modeste par la respiration mitochondriale [208-210]. D'autres sources biologiques directes et indirectes du superoxyde ont aussi été identifiées : la NAD(P)H oxydase [211], la xanthine oxydase [212], la synthase de l'oxyde nitrique endothéliale [213] et des isoformes du cytochrome p450 monooxygénase [214].

L'anion superoxyde est capable d'activer les voies dépendantes des tyrosines kinases [215] qui sont aussi utilisées pour la signalisation des récepteurs des facteurs de croissance. À faibles concentrations, l'anion superoxyde est considéré comme un facteur hypertrophiant ou prolifératif pour la plupart des types cellulaires.

4.1.2 Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH^\cdot) est un produit engendré par l'action du fer sur l'anion superoxyde tel que décrit par le cycle de Haber-Weiss ou par l'action du fer sur le peroxyde selon la réaction de Fenton [193]. Cependant, une production indépendante de l'hydroxyle par l'acide arachidonique dans les plaquettes humaines a été rapportée [216]. Puisque dans cette expérience la catalase ou la SOD n'ont pas eu d'effet sur la génération d'hydroxyle, on peut supposer qu'il existe des mécanismes biologiques pouvant produire directement le radical hydroxyle. L'effet le mieux décrit et le plus connu des radicaux hydroxyles est la peroxydation des lipides. Un exemple serait l'oxydation d'une chaîne d'un acide gras par un radical hydroxyle (figure 9). La chaîne de cet acide gras devient à son tour une espèce radicalaire. Le radical hydroxyle peut cependant réagir avec des hydrates de carbones, des acides nucléiques et des acides aminés. Par sa forte réactivité et sa faible diffusion combinées à l'absence d'un système enzymatique spécifique pour contrer ses effets, le radical hydroxyle est considéré comme l'un des radicaux les plus toxiques pour l'organisme. Par exemple, dans la muqueuse gastrique, les radicaux hydroxyles sont impliqués dans la formation de lésions alors que les radicaux superoxydes et le peroxyde d'hydrogène sont impliqués dans le recrutement des neutrophiles [217].

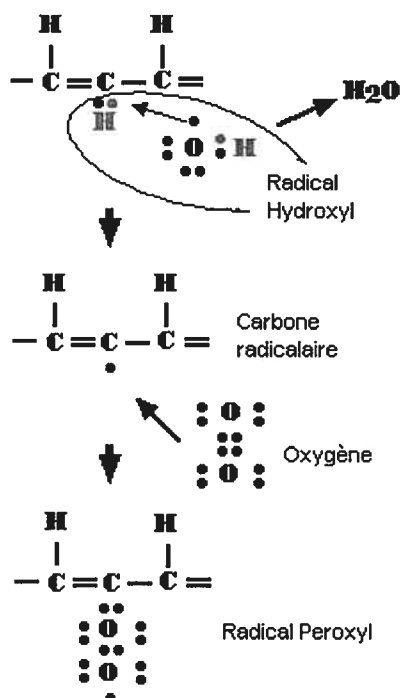


Figure 9 : Peroxydation d'une chaîne insaturée lipidique par le radical hydroxyle.

4.1.3 Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical, mais est un puissant agent oxydant ou réducteur et est produit à partir de la dégradation de l'anion superoxyde. Dans des lipocytes, certaines NAD(P)H oxydases produisent directement le peroxyde d'hydrogène [218] sous l'action de l'insuline, alors que dans les tissus vasculaires, le peroxyde d'hydrogène provient presque exclusivement de la dégradation de l'anion superoxyde. Le composé a une demi-vie physiologique relativement longue de quelques secondes et traverse aisément les membranes biologiques. Le peroxyde d'hydrogène peut aussi se lier temporairement à des protéines, ce qui augmente sa distance possible de diffusion [219]. La relative stabilité et la bonne capacité de diffusion du peroxyde d'hydrogène ont

favorisé l'élaboration de plusieurs hypothèses sur son rôle comme molécule de signalisation cellulaire. Le peroxyde d'hydrogène sert également de substrat pour les enzymes peroxydases ce qui en fait un constituant biologique important pour le fonctionnement normal des organismes vivants.

Le peroxyde d'hydrogène est connu pour ses effets vasoactifs. Il produit une vasoconstriction dans l'aorte de rat selon un mécanisme dépendant du calcium par l'activation de canaux calciques voltage-dépendants [220-222]. Il peut aussi libérer le calcium du réticulum sarcoplasmique par l'activation des récepteurs à ryanodine [223]. Le peroxyde d'hydrogène a aussi été impliqué dans la relâche de calcium à partir des mitochondries par le biais de la formation du radical hydroxyle [224]. Le calcium relâché lie une calmoduline pour activer la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) ce qui amorce la contraction musculaire. D'autres voies activées par le peroxyde d'hydrogène ont été impliquées dans la contraction des muscles lisses vasculaires : les voies tyrosines kinases, les produits des cyclooxygénases, la protéine kinase C, les Rho-kinases et les différentes voies MAPK [225].

Par contre, une étude sur des artères de résistances mésentériques a montré que le peroxyde d'hydrogène avait des effets vasoconstricteurs à l'état basal, mais avait un effet vasodilatateur lorsque les vaisseaux étaient préalablement contracté par la phényléphrine [226]. Des résultats similaires ont été décrits lors d'une précontraction avec le chlorure de potassium [222]. Il a été suggéré que le potentiel de membrane de la cellule pouvait affecter l'effet du peroxyde d'hydrogène sur le tonus vasculaire. Des effets

vasodilatateurs endothélium-dépendant par l'augmentation de la relâche d'oxyde nitrique [227] et endothélium-indépendants par l'activation directe de la guanylate cyclase et par l'ouverture de canaux potassiques ont été identifiés [228, 229]. Le peroxyde d'hydrogène active sa propre formation en activant la NAD(P)H oxydase [230] et une petite quantité de peroxyde provenant de la NAD(P)H oxydase peut entraîner une activation soutenue de l'enzyme [231].

4.2 Les sources de radicaux dans le système cardiovasculaire

Bien que le stress oxydant soit souvent perçu comme un agent exogène issu de facteurs environnementaux (rayonnements UV, pollution, produits chimiques usuels...), la majeure partie des espèces radicalaires est produite par l'organisme lui-même, principalement par les cellules du système immunitaire. Une portion plus modeste des radicaux est produite par les tissus. La production tissulaire endogène est cependant soutenue et contrôlée par une variété d'enzymes et de voies de signalisation. En ce qui concerne les radicaux produits au niveau du système cardiovasculaire, les sources sont relativement variables et sont associées à des situations pathologiques différentes.

4.2.1 La chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est le centre de la production aérobie d'énergie de l'organisme. La présence d'oxygène et de la chaîne de transport des électrons offre des conditions propices à la relâche de radicaux. Des mitochondries isolées du myocarde produisent une

quantité appréciable d'anion superoxyde provenant d'une 'fuite' du transport électronique au sein de la membrane interne de la mitochondrie [232-235]. Cette production de radicaux libre peut être amplifiée par une exposition à un environnement hyperbarique ou hyperoxyque lors d'une reperfusion d'un tissu [236-238]. Des études de la mitochondrie isolée ont montrés que la réduction de l'oxygène en anion superoxyde se produisait surtout au niveau du complexe I et du complexe III [239] (figure 10). Le principal radical produit est l'anion superoxyde, rapidement converti en peroxyde d'hydrogène et en radical hydroxyle [240]. La production accrue d'anion superoxyde par les mitochondries de personnes âgées est d'ailleurs associée à une baisse de la synthèse des isoformes de la coenzyme Q qui est un transporteur d'électrons à partir du complexe I. Les électrons, faute de transporteur, sont ainsi relâchés et vont se lier à l'oxygène pour former de l'anion superoxyde [241]. La coenzyme Q10, lorsque utilisée comme supplément, est d'ailleurs considérée comme un antioxydant bien que son mode d'action ne soit pas vraiment élucidé.

Cytoplasme cellulaire

Membrane externe mitochondriale

Espace intermembranaire mitochondrial

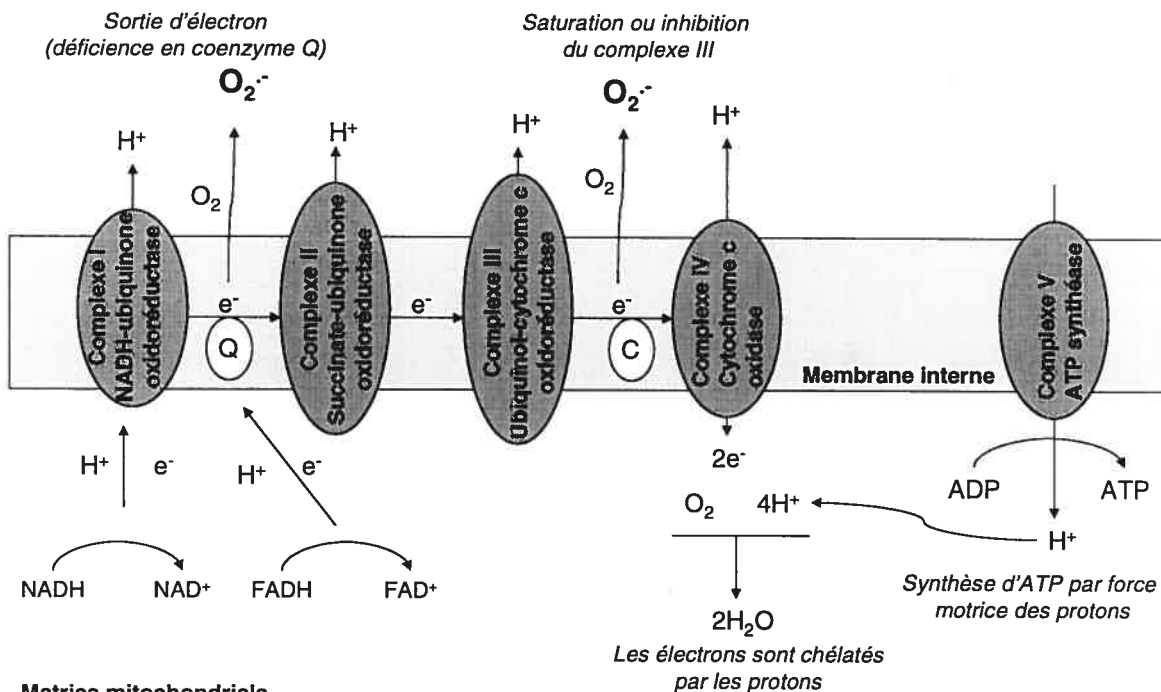


Figure 10 : L'anion superoxyde issu de la chaîne d'électrons mitochondriale.

Légende : Q, coenzyme Q; C, cytochrome c.

Il a été montré que les mitochondries issues d'animaux diabétiques produisent moins d'ATP [242] et sont une source majeure d'anion superoxyde [243, 244]. La saturation de la chaîne électronique mitochondriale est l'hypothèse présentement acceptée pour expliquer ce phénomène dans le diabète [245]. Le surplus d'électrons de la mitochondrie, sous forme d'anion superoxyde, est majoritairement chélaté par un influx de protons provenant de l'ATP synthase. Le diabète est associé à un surplus de combustibles métaboliques (lipides, glucose...). Ce surplus amène une augmentation de la production de donneurs d'électrons (NADH et FADH) par l'activation du cycle de l'acide

tricarboxylique et une accélération de la chaîne de transfert électronique et de l'activité de la NADH déshydrogénase. Éventuellement, la chaîne de transfert électronique se sature à son étape limitante, le complexe III, et est bloquée. La production d'ATP devient moins efficace et l'anion superoxyde peut donc s'accumuler.

4.2.2 Les dérivés de l'acide arachidonique et leurs enzymes

L'acide arachidonique est un acide gras essentiel, substrat de voies connues pour leurs rôles dans la régulation de la transmission de la douleur, dans la régulation de fonctions immunitaires et dans la régulation de fonctions cardiovasculaires. L'acide arachidonique est un acide gras insaturé sur quatre liens qui fait partie de la famille des oméga-6. Cet acide gras provient directement de la diète ou de la conversion d'acides gras oméga-6, comme l'acide linoléique, et de la relâche de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par l'action des phospholipases A₂ [246]. L'acide arachidonique peut aussi provenir de la conversion de la phosphatidyl-éthanolamine ou choline en acide phosphatidique par la phospholipase D (PLD) et par la dégradation du phosphatidylinositol par un mécanisme amorcé par la phospholipase C. Trois familles d'enzymes ayant pour substrat l'acide arachidonique ont été identifiées comme sources potentielles de radicaux libres : les cyclooxygénases, les lipoxygénases et les cytochrome 450 monooxygénases (figure 11).

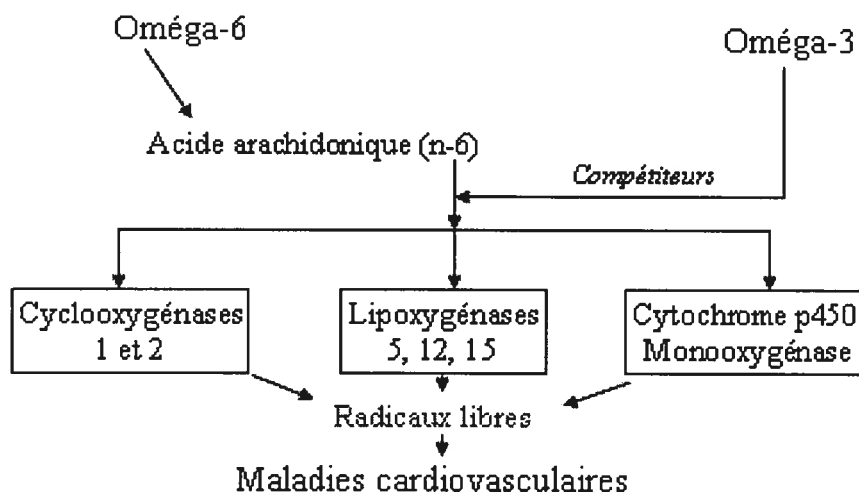


Figure 11 : Les voies reliées à l'acide arachidonique et la production de radicaux

4.2.2.1 Les cyclooxygénases

Les cyclooxygénases (COX) sont des cibles pharmacologiques depuis longtemps exploitées en médecine naturelle avant même la synthèse de l'acide salicylique par Kolbe en 1874 et de la commercialisation de l'acide acétylsalicylique par Felix Hoffman en 1899 [247]. Le médicament le mieux connu au monde, l'aspirine, est décrit par la compagnie comme un analgésique, anti-pyrétique et anti-inflammatoire [248]. Le mode d'action n'a été découvert que beaucoup plus tard en 1971 [249] par la mesure des effets de l'aspirine dans un extrait de prostaglandine synthase (cyclooxygénase).

Une étude sur des cellules épithéliales de la trachée a montré une augmentation de l'activité cyclooxygénase après une culture prolongée. Cette augmentation n'était pas

associée à la surexpression de l'ARNm de la COX1 originalement identifiée, mais plutôt à la surexpression d'un autre ARNm [250]. Par la suite, un type 'constitutif' et un type 'inductible' de cyclooxygénases ont été identifiés en traitant des monocytes avec des liposaccarides bactériens [251, 252]. L'existence d'une autre forme de cyclooxygénase 60% analogue à la forme originale, la COX2, a été confirmée dans des cellules embryonnaires de poulet par biologie moléculaire [253].

Les cyclooxygénases sont des enzymes localisées au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire. Elles comprennent trois domaines : un domaine en surface analogue à des facteurs de croissance, un domaine membranaire qui fixe l'enzyme et un domaine enzymatique légèrement distinct entre les COX1 et COX2 [254]. Les cyclooxygénases forment un cycle avec l'acide arachidonique pour produire la prostaglandine PGG₂ et ensuite la fonction peroxydase de l'enzyme réduit la PGG₂ en PGH₂ (figure 12). Ces enzymes possèdent 2 sites catalytiques leur permettant de jouer un rôle d'oxydation puis de peroxydation. Les endoperoxydes PGG₂ très instables donnent naissance aux différents prostanoïdes par l'action de différentes isomérases ou synthases. Ces prostanoïdes comprennent : les prostaglandines : PGE₂, PGF₂, PGD₂, la prostacycline (PGI₂) et le thromboxane A₂ (TXA₂). Ces produits appartiennent à la série 2 dérivée de l'acide arachidonique (les molécules ont 2 liens insaturés). Cependant, d'autres substrats ont le potentiel de produire d'autres séries de prostanoïdes [255-258]. Les prostanoïdes formées varient selon l'activité enzymatique de la cellule. La plupart des tissus sont capables de synthétiser les intermédiaires PGG₂ et PGH₂ à partir de l'acide arachidonique.

À titre d'exemple, on retrouvera principalement du TXA_2 au niveau des plaquettes et de la PGI_2 au niveau des cellules endothéliales.

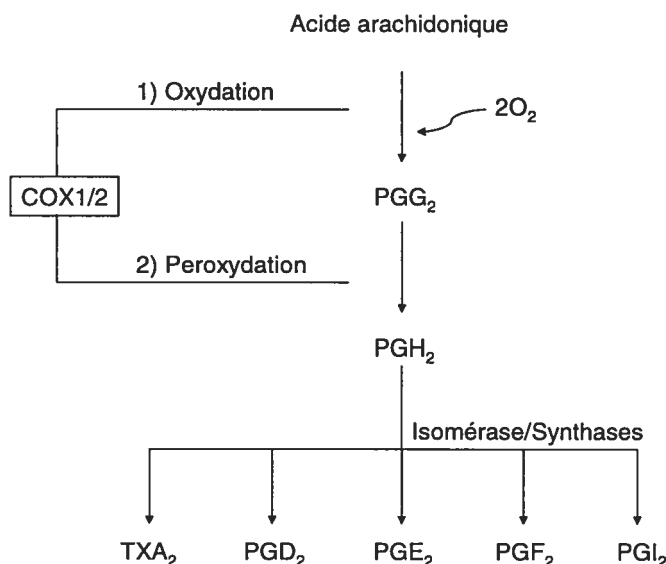


Figure 12 : Les produits des cyclooxygénases

Traditionnellement, les COX1 sont décrites comme des enzymes constitutionnelles, localisées essentiellement au niveau du réticulum endoplasmique, en constant renouvellement et responsables de maintenir l'homéostasie dans certains organes, par exemple la production de mucus et de bicarbonates sur la paroi de l'estomac [259]. Les COX-2 sont plutôt perçues comme des enzymes inductibles, localisées essentiellement au niveau de la membrane nucléaire, activées par des réactions inflammatoires et par les cytokines produites par différentes cellules dont les macrophages et les monocytes. La production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à

l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) [260].

4.2.2.1.1 La production de radicaux libres par les cyclooxygénases

L'aspirine a été proposée comme un antioxydant majeur et les cyclooxygénases ont été proposées comme des sources de radicaux libres dans le système cardiovasculaire. Un traitement à l'aspirine est capable de diminuer la production de radicaux libres dans les vaisseaux de rats spontanément hypertendus et de rétablir en partie la vasodilatation dans ce modèle [261]. L'aspirine a aussi prévenu l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque et la production d'anion superoxyde chez le rat traité à l'angiotensine II [262] et chez le rat insulino-résistant traité au glucose [263]. Puisque l'angiotensine II est un important médiateur de l'inflammation et est capable d'augmenter l'expression de la COX2 [264], il a été proposé que l'effet oxydant de l'angiotensine II est dépendant de la surexpression de la COX2. Des inhibiteurs sélectifs des COX2 ainsi que l'aspirine ont prévenu la production d'anion superoxyde dans les tissus cardiovasculaires de rats traités à l'angiotensine II alors que des inhibiteurs de la COX1 ont eu peu d'effet sur la production d'anion superoxyde dans le colon des animaux (exprimant la COX1). Il a aussi été rapporté que l'activation et la surexpression de la COX2 serait liée à l'activation de l'enzyme NAD(P)H oxydase [261, 265].

L'association étroite entre la synthèse de prostanoïdes et l'activité du système immunitaire, en particulier la relâche de radicaux libres par les macrophages, font en

sorte qu'une augmentation excessive de l'activité cyclooxygénase est associée à la relâche de radicaux libres, en particulier l'anion superoxyde. Ce phénomène a été observé chez l'animal et chez l'homme. Chez le rat, l'inhibition des cyclooxygénases et des lipoxygénases dans les neutrophiles [266] et les macrophages pulmonaires [267] prévient la production d'anion superoxyde par ces cellules. Aussi, la production d'anion superoxyde dans les corps jaunes de rates peut être inhibée par des inhibiteurs des cyclooxygénases [268]. Les espèces radicalaires, en particulier l'anion superoxyde, produites au niveau de l'endothélium de capillaires du cerveau de rats suite à une anoxie et une réoxygénation sont produites par des mécanismes dépendant de la xanthine oxydase et des cyclooxygénases [269]. Chez le porc, l'ibuprofène, un inhibiteur plus ou moins spécifique de la COX1, peut atténuer l'effet d'un choc respiratoire des neutrophiles pulmonaires [270] et une atteinte du tissu nerveux par un choc augmente la production d'anion superoxyde par un mécanisme cyclooxygénase-dépendant [271]. De plus, une étude mesurant les effets d'une stimulation de la relâche de calcium sur la contraction dans les artères basilaires de chien a montré que l'activité cyclooxygénase était augmentée en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire et entraînait une augmentation de la production d'anion superoxyde par les cellules endothéliales [272].

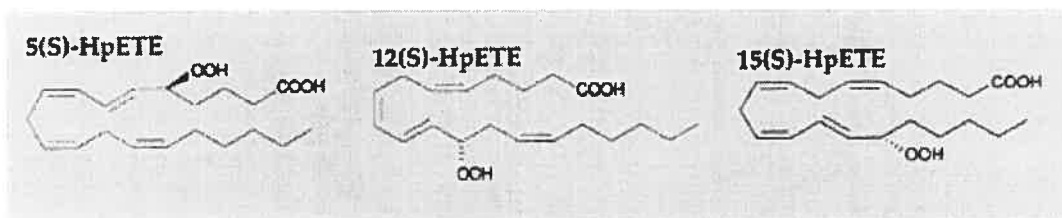
Les données actuelles suggèrent que les cyclooxygénases sont associées à une production d'anion superoxyde dans plusieurs tissus par le biais de la production de prostanoïdes, en particulier dans les leucocytes activés et à la surface interne vasculaire. Cette production est probablement dépendante de l'activité de la NAD(P)H oxydase, enzyme

principalement active dans les leucocytes, mais aussi importante dans la production d'anion superoxyde vasculaire. Les détails entourant les mécanismes exacts et les prostanoïdes impliquées dans cette production d'anion superoxyde sont toutefois peu connus.

4.2.2.2 Les lipoxygénases

Les lipoxygénases (LOX) sont des enzymes appartenant à la classe des oxydoréductases qui catalysent des réactions entre des acides gras insaturés et l'oxygène pour former des hydroperoxydes d'acide gras. On connaît des 5- des 12- des 15-LOX qui vont donner naissance aux hydroperoxydes (acides hydroperoxyeicosatétraénoïques ou HPETE) puis, sous l'effet d'une enzyme déhydrase, aux hydroxyacides (acides hydroxyeicosatétraénoïques ou HETE) à partir d'acide gras insaturés de 18 à 20 carbones avec une préférence pour l'acide arachidonique [273]. Les numéros des trois types de lipoxygénases déterminent la position du carbone à partir de la fonction acide sur lequel l'enzyme ajoute une fonction hydroperoxyde (-OOH) (Figure 13).

Action de la lipoxgénase



Action de la déshydrase

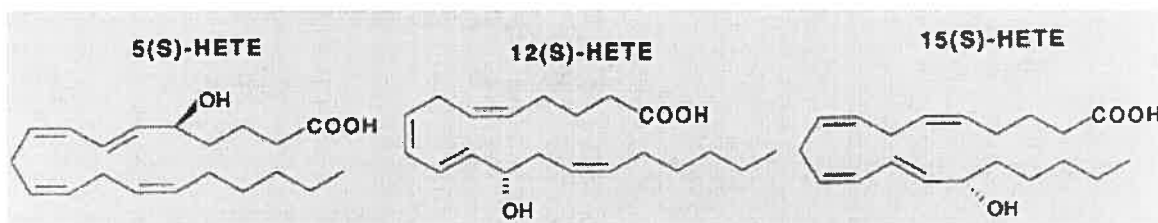


Figure 13 : Hydroxyperoxydation et déshydratation de l'acide arachidonique

Les HETE sont produits dans plusieurs types de cellules humaines. On les retrouve dans les vaisseaux, l'épithélium et la neuroglie. Ils peuvent aussi être incorporés dans les phospholipides membranaires.

Alternativement au 5-HETE, les 5-LOX permettent la libération de composés doués de propriétés biologiques importantes : les leucotriènes à partir du 5-HPETE [274]. Les premières découvertes relatives aux leucotriènes ont été effectuées en 1938 [275]. Ces chercheurs avaient identifié une substance, la *slow reaction smooth muscle-stimulating substance* (SRS), isolée du tissu pulmonaire après une exposition à l'histamine ou à du venin de cobra. Les constituants du SRS libéré au cours de la réaction anaphylactique sont identifiés pour la première fois en 1979 [276] et nommés leucotriènes.

Les lipoxygénases forment en deux étapes, à partir de l'acide arachidonique, un composé instable, le leucotriène A₄ (LTA₄). Relativement au type cellulaire et les enzymes associés, le LTA₄ sera converti en différents produits. Dans les monocytes et les neutrophiles, la LTA₄ hydrolase produit le leukotriène B₄ (LTB₄). Le LTB₄ possède un effet de chimiotactisme important pour les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, macrophages) et les monocytes et les lymphocytes qui libèrent des cytokines. Par ailleurs, les cellules polynucléaires neutrophiles, attirées par le LTB₄, peuvent libérer des hydroxyperoxydes qui peuvent sensibiliser directement, comme les prostaglandines, les nocicepteurs de la fibre afférente primaire. Les mastocytes et les éosinophiles expriment la LTC₄ synthase pour former des leucotriènes cystéinés (les LTC₄, D₄ et E₄) qui possèdent un effet prédominant sur les microvaisseaux (veinules post-capillaires notamment) et entraînent l'exsudation de plasma et l'œdème lors de la réaction inflammatoire. Ces molécules sont aussi fortement bronchoconstrictrices et augmentent la synthèse de mucus dans les voies respiratoires.

La voie lipoxygénase produit aussi des composés appelés lipoxines A₄ et lipoxines B₄ (LXA₄ et B₄) [277]. La production de lipoxines est le résultat d'une coopération entre les voies lipoxygénases appartenant à plusieurs types cellulaires différents [278]. Les macrophages peuvent utiliser le 15-HETE relâché par les cellules endothéliales pour former les lipoxines avec la 5-LOX [279]. Le LTA₄ peut être également transformé par la 12-LOX des plaquettes ou la 15-LOX des macrophages en lipoxines [280]. Les lipoxines exercent surtout des effets anti-inflammatoires en diminuant la relâche de leucotriènes [281] ou en inhibant la transmigration des neutrophiles au travers des

cellules endothéliales [282]. L'aspirine a d'ailleurs été identifiée comme un stimulateur de la relâche de lipoxines [283]. L'aspirine peut acétyler la COX2 et changer son activité catalytique pour produire avec la 5-lipoxygénase des lipoxines de types A₄ et B₄ [284].

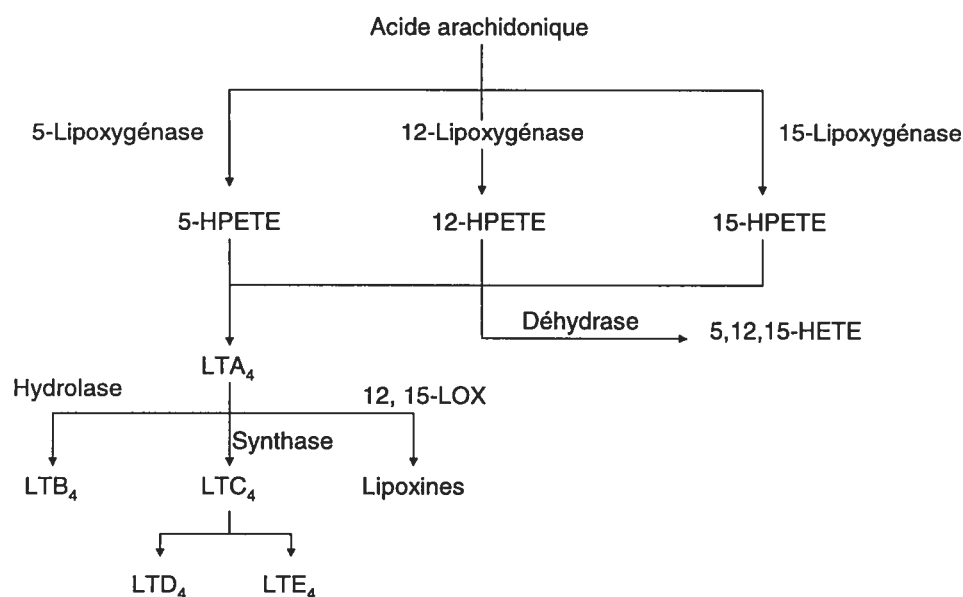


Figure 14 : Les produits des lipoxygénases.

La 5-LOX a reçu plus d'attention en recherche à cause de son implication dans la synthèse des leucotriènes, par contre les rôles exacts des 12 et 15-LOX et du 12,15-HETE restent plus ou moins connus. Les 12 et 15-LOX ont la propriété de produire tous les deux des 12 et 15-HETE et sont exprimés dans une grande variété de tissus [285, 286]. Les 12,15 HETE sont des stimulants puissants de la prolifération cellulaire et de l'inflammation, bien que leurs cibles ne soient pas vraiment identifiées. Les 12,15-HETE peuvent lier le PPAR- α (*peroxisome proliferation-activated receptor*) [246, 287] mais

l'effet de cette interaction reste peu connue. Des résultats récents suggèrent que les 12,15-LOX soient impliqués dans l'expression de I-CAM à la surface des cellules endothéliales [246, 288]. Les 12-HETE seraient impliqués dans la vasoconstriction de l'angiotensine en activant des canaux calciques de type-L [289]. Les 12,15-LOX augmentent la synthèse d'interleukines et du NFkB dans les cellules de muscles lisses vasculaires [290]. Un type leucocytaire de 12,15-LOX est exprimé dans les cellules de muscles lisses vasculaires et jouerait un rôle important dans la migration, l'hypertrophie et dans la signalisation des facteurs de croissances de ce type cellulaire [291].

Peu d'inhibiteurs spécifiques des lipoxygénases sont utilisés en médecine. Zileuton, un inhibiteur de la 5-lipoxygénase est utilisé pour traiter l'asthme. Le gingembre, un inhibiteur naturel non sélectif, est aussi utilisé en médecine traditionnelle chinoise.

4.2.2.2.1 Les lipoxygénases et la production de radicaux

Par leurs effets sur le recrutement et l'activation des cellules immunitaires, en particulier les macrophages, la plupart des composés issus de l'action des lipoxygénases activent indirectement la relâche de radicaux libres par ces cellules. Les cytokines relâchées par l'action des leucotriènes, en particulier LTB₄ sont des molécules pro-oxydantes et exercent leurs effets par l'enzyme NAD(P)H oxydase [292]. La 5-LOX est impliquée dans l'activation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II par la formation de LTB₄ [246, 293]. L'activité lipoxygénase est une source d'anion hydroxyle à partir de l'acide arachidonique dans les plaquettes sanguines humaines [216]. Dans ces plaquettes, la

production d'anion superoxyde est bloquée par l'inhibition des lipoxygénases, mais non par l'inhibition des cyclooxygénases. La production de 12-hydroxyeicosatetraenoïque (12-HETE) semble aussi associée avec la production d'anion superoxyde [294].

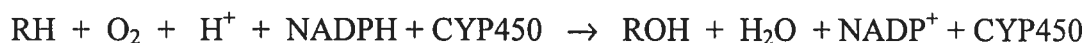
L'activité des 12,15-lipoxygénases a été impliquée dans l'athérosclérose, l'hypertension et le diabète. Une étude a montré que les 12,15-LOX des leucocytes étaient impliqués dans l'oxydation des LDL et contribuaient au développement de l'athérosclérose par ce mécanisme et par leur propriétés prolifératives et inflammatoires [295]. Cette contribution a aussi été observée dans des animaux diabétiques [296]. Une déficience génétique des 12,15-LOX ou de la synthèse de l'interleukine-12 atténue l'athérosclérose dans un modèle de souris hypercholestérolémiques [297-299]. Les macrophages dans les sites de lésions athérosclérotiques surexpriment les 12,15-LOX [300, 301]. Des souris transgéniques surexprimant les 12,15-LOX et déficientes en récepteurs de LDL ont un développement des lésions athérosclérotiques accéléré [302, 303]. La provenance de l'anion superoxyde produit par les 12,15-lipoxygénases reste inconnue.

4.2.2.3 Les cytochromes p450 monooxygénases.

Les cytochromes p450 existent sous des centaines de formes et ont tous en commun un thiolate comme ligand axial du fer au centre d'un noyau hème. Ce sont d'ailleurs les propriétés de ce chromophore qui lui ont donné le nom : en 1963, deux chercheurs japonais, Sato et Omura, ont appelé 'pigment 450' le composé responsable du pic d'absorbance à 450 nm qui apparaît quand on sature en monoxyde de carbone une

préparation subcellulaire de glandes surrénales par le sodium dithionite [304, 305]. Les différents cytochromes sont issus de plus de 30 gènes [306] et sont impliqués dans le métabolisme oxydatif de composés exogènes (médicaments, toxines, polluants...) et aussi de composés endogènes (vitamines, protéines, acides gras...). On trouve les cytochromes P450 dans la plupart des êtres vivants : dans les archéobactéries, des eubactéries, des plantes et les animaux. Chez les mammifères, toutes les cellules étudiées jusqu'à maintenant expriment un ou plusieurs gènes reliés aux cytochrome p450 [307]. Les organes particulièrement riches en p450 sont le foie et les glandes surrénales. Chez l'homme, les grandes familles des cytochromes sont désignées CYP1A, CYP2C, CYP3A. Les cytochromes p450 ont une faible sélectivité pour une catégorie de substrats (ex. : des stéroïdes, des eicosanoïdes...), mais vont par contre toujours modifier leurs substrats aux mêmes sites chimiques (ex. : une hydroxylation en position 6 α sur un cycle).

Généralement, le cytochrome P450 (CYP450) transforme un substrat hydrophobe (RH) en produit hydrophile (ROH) souvent par l'introduction d'une fonction hydroxyle.



Au cours de cette réaction, le fer de l'hème est le transporteur électronique et le NADPH, par le biais d'une NADPH réductase, fournit les électrons nécessaires à la réduction de ces composés [308]. Sous certaines conditions, il peut y avoir relâche directe d'anion superoxyde au cours de cette réaction (figure 15).

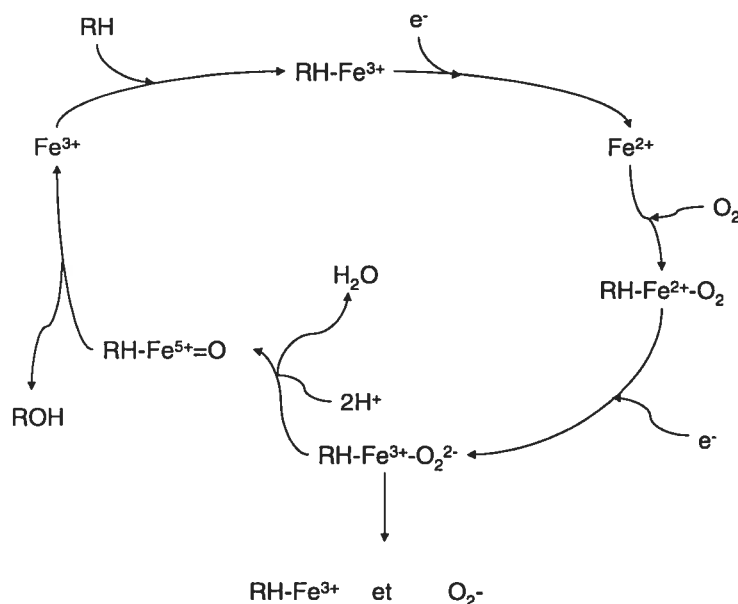


Figure 15 : Réactions de transferts d'électrons dans l'hydroxylation d'un composé par un cytochrome p450.

Les premières études sur le métabolisme de l'acide arachidonique par les cytochromes p450 ont montré que plusieurs types d'acides gras polyinsaturés pouvaient interagir avec le noyau hème des cytochromes [309]. Il a ensuite été montré que les résultats de ces réactions étaient la production d'une variété de produits hydroxy et époxygénés dérivés de l'acide arachidonique. Ces produits sont principalement des acides epoxyeicosatriénoïques (EET), des acides hydroxyeicosatriénoïques (HETE) et des hydroxyles de l'acide arachidonique (OH-AA) [310].

Les rôles fonctionnels de ces composés sont multiples et incluent la régulation de relâche d'hormones hypothalamiques, de la rénine et de l'insuline et du glucagon [311, 312]. Un

intérêt récent pour les rôles des métabolites de l'acide arachidonique sur le tonus vasculaire a permis de mieux définir la fonction de certains métabolites. En général, les EET ont des effets vasodilatateurs et anti-inflammatoires et les OH-AA ont des effets vasoconstricteurs bien que ces rôles aient souvent été contredits dépendamment des conditions et des tissus utilisés [308].

Le rôle des cytochromes p450 dans la régulation vasculaire par la production d'acides HETE a été relié à l'activité de certains isoformes de l'enzymes (2B, 2C8, 2C9, 2C10, et 2J2 chez l'humain, 2C34 chez le porc et 2C11, 2C23, et 2J4 chez le rat) [313]. Le CYP2C9 endothélial qui métabolise l'acide arachidonique en acides EET est une source de radicaux dans les artères coronaires [314]. Certains cytochromes sont prédominants dans le cœur et le réseau vasculaire. Le cœur exprime les CYP 1A1, 2B6/7, 2C8-19, 2D6, and 2E1 [315], l'activité du type 2E1 est augmentée chez les fumeurs, les diabétiques et les insuffisants cardiaques [316-318]. L'activité du cytochrome p450 a été proposée comme une cause possible d'hypertension [319]. En effet, une inhibition des cytochromes p450 ou l'utilisation d'un ARN antisens contre les isoformes 4A ont prévenu l'augmentation de l'hypertension chez le rat SHR [320, 321].

Les cytochromes p450 sont d'importantes sources de radicaux libres, en particulier lors de la reperfusion de tissus ischémiques [322]. L'inhibition des cytochromes p450 par le chloramphénicol a réduit la taille des infarctus induits sur des cœurs de rats et de lapins perfusés selon le modèle de langendorff [323]. Le cytochrome CYP2E1 est responsable des dommages mitochondriaux dans une lignée cellulaire hépatocytaire HepG2 [324].

Ces dommages sont induits par une production de radicaux stimulée par un traitement à l'acide arachidonique et une peroxydation des lipides suivis d'un influx de calcium et d'une suractivation des protéases calcium dépendantes.

Les cytochromes p450 sont également responsables de la formation de 20-HETE dans les cellules vasculaires rénales de muscles lisses [325]. Cet agent est un puissant vasoconstricteur par le blocage des canaux potassiques calcium dépendent. Ce produit est responsable de la réponse myogénique des artérioles rénales et joue un rôle essentiel dans l'autorégulation du flux sanguin rénal. Le 20-HETE est aussi produit dans l'anse de Henle et régule le transport sodium-potassium-chlorure. Le cytochrome p450 produit aussi des acides EET formés dans l'endothélium des artères rénales qui sont de puissants vasodilatateurs ayant un effet inverse du 20-HETE sur les canaux potassiques. Les EET et 20-HETE favorisent aussi la natriurèse et des rats Dahl sensibles au sel présentent une déficience de la synthèse de 20-HETE dans la branche ascendante de l'anse de Henle. Les métabolites des cytochromes p450 ont donc des effets opposés sur la pression artérielle et le 20-HETE a un effet variable selon les régions vasculaires concernées [325].

4.2.2.4 La synthèse de l'oxyde nitrique (NOS)

Les oxydes nitriques synthases (NOS) sont les enzymes responsables de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) à partir de l'arginine incluant la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inductible (iNOS) [326]. La eNOS est un des principaux points d'intérêt dans l'étude de la dysfonction endothéliale puisque l'enzyme est la source

du NO impliqué dans le contrôle du tonus vasculaire alors que la iNOS est plutôt induite lors d'une réponse inflammatoire [327]. Le NO est un radical qui participe à une série de réactions de type redox capable de modifier ou d'endommager des constituants biologiques (figure 16).

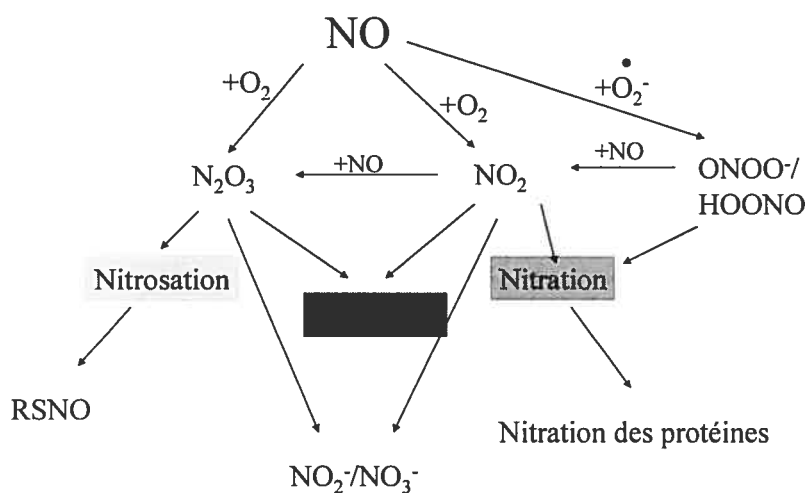
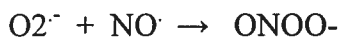


Figure 16 : Les produits de réactions du NO

Dans un milieu aqueux, la demi-vie du NO[•] diminue exponentiellement lorsque sa concentration augmente, soit 800 secondes pour 1 μM et 8 secondes pour 100 μM à cause de sa capacité à s'autooxyder : $2 \text{ NO}^{\bullet} + \text{O}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$

In vivo, la demi-vie du NO[•] est probablement beaucoup plus courte à cause des réactions chimiques avec les molécules biologiques environnantes, par exemple l'hémoglobine qui réduit la demi-vie du NO[•] à quelques secondes [328, 329].

L'oxyde nitrique produit par la eNOS, bien qu'étant un radical, a une réactivité tout de même faible et est relativement stable. Le potentiel réducteur du NO^\cdot est d'environ 0,39 V comparativement à 2,31 V pour l'anion hydroxyle (table 1) [330]. Également, la plupart de ces réactions impliquent d'autres types de radicaux plus réactifs, en particulier l'anion superoxyde pour la formation du peroxynitrite. L'anion superoxyde peut réagir avec le NO^\cdot pour former le peroxynitrite (ONOO^-) [204, 331] et ainsi réduire la biodisponibilité de ce facteur vasodilatateurs et antiprolifératif. Le peroxynitrite est considéré comme une molécule cytotoxique capable de produire la peroxydation des lipides en formant des radicaux hydroxyles [332, 333] .



Le peroxynitrite peut induire la nitration de molécules biologiques, en particulier sur les tyrosines des protéines.

Espèce	E°/mV
HO• / OH-	+2310
RO• / RO-	+1600
H ₂ O ₂ / H ₂ O	+1349
ROO• / ROO-	+1000
GS• / GS- (Glutathion)	+920
O ₂ •- / H ₂ O ₂	+900
TO• / TO- (Tocophérol)	+480
NO• / NO-	+390
Ascorbate• (vitamine C) / Ascorbate-	+282
O ₂ / O ₂ •-	-330

Table 1 : Potentiels de réduction (rédox) de différents radicaux à pH 7.

Le potentiel de réduction standard (E°) est mesuré à 25°C, pour des concentrations de 1M à une pression de 1 atmosphère pour les gaz faisant partie de la réaction. La valeur 0 mV est le potentiel de réduction relatif à l'électrode à hydrogène ($2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2$).

La valeur, en millivolts (mV) pour une réaction A/B, représente la tendance du composé A à effectuer une réaction d'oxydo-réduction pour former le composé B.

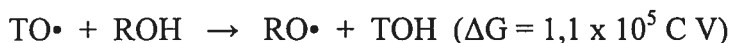
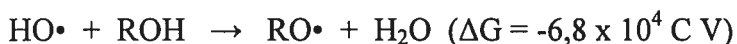
Par exemple, dans la transformation d'un groupe ROH en radical RO• par le radical hydroxyle ou par le radical tocophérol :



Si on calcule l'énergie libre (ΔG) de la réaction selon l'équation de Gibbs :

$$\Delta G = -n F \Delta E \quad F = 96485 \text{ Coulombs/mole (constante de Faraday)}$$

n = nombre d'électrons



La valeur de la réaction avec le radical hydroxyle est négative alors que la réaction avec la vitamine E est positive. Puisque les réactions chimiques tendent vers une énergie libre minimale, la réaction avec le radical hydroxyle est plus probable qu'avec la vitamine E.

Le radical hydroxyle est donc beaucoup plus réactif que le radical tocophérol.

4.2.2.4.1 Le découplage de la NOS

La NOS produit le NO^\bullet à partir de la L-arginine (figure 17) [334, 335] :

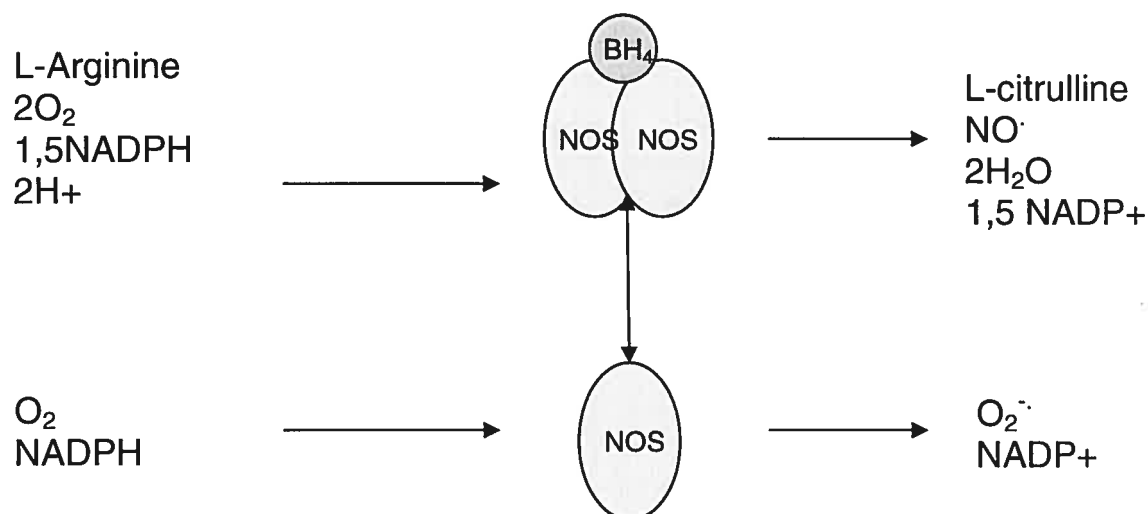


Figure 17 : Production d'anion superoxyde par la NOS découplée.

Sous certaines conditions, la NOS synthase peut cependant produire de l'anion superoxyde [213]. Cette production est dépendante de la présence ou de l'absence d'un cofacteur, la tétrahydrobioptérine (BH_4) [336]. La BH_4 joue un rôle essentiel pour maintenir la NOS sous forme dimérique, productrice de NO^\bullet , plutôt que sous forme monomérique, productrice d'anion superoxyde [337]. La BH_4 est instable en présence d'oxygène et de radicaux [338]. Une augmentation locale de radicaux libres peut donc favoriser le découplage de la NOS. La génération de radicaux par la NOS est donc souvent un effet de radicaux initialement présents. La NOS viendrait donc amplifier un système oxydatif local, bien que l'impact physiologique majeur du changement de vocation de l'enzyme est probablement davantage causé par la perte de la production du NO^\bullet . Cependant, une

étude a montré un rôle significatif de la NOS découplée dans la production d'anion superoxyde dans les plaquettes de patients diabétiques et hypertendus [339].

4.2.2.5 La xanthine oxydase

La xanthine oxydase ou XO, est une enzyme de la chaîne de dégradation des purines qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et qui de plus catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique :

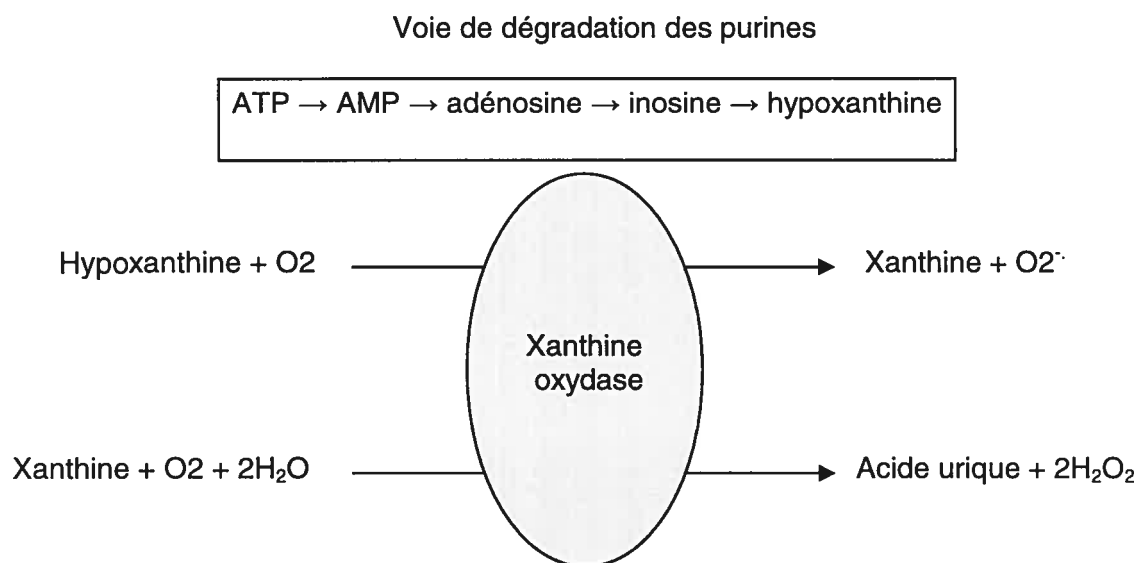


Figure 18 : Production de radicaux par la xanthine oxydase.

Cette grande protéine (270 000 KDa) est liée à deux molécules de flavine, deux atomes de molybdène et huit atomes de fer. L'enzyme, présente dans le lait de vache, est étudiée depuis plus d'un siècle [340]. La xanthine oxydase est une enzyme qui forme de l'anion superoxyde dans les étapes finales du catabolisme des purines (figure 18).

Chez l'homme, la xanthine oxydase se retrouve normalement dans le foie et sous une forme non libre dans le sang. En cas d'atteinte hépatique grave, la xanthine oxydase est larguée dans le sang, si bien qu'une mesure sanguine de XO permet de déceler des dommages hépatiques. L'allopurinol est un inhibiteur de la xanthine oxydase souvent utilisé dans le traitement de la goutte puisque que la xanthine oxydase est une voie métabolique de la formation de l'acide urique [341].

L'activité de la xanthine oxydase a aussi été détectée dans le cytosol des cellules endothéliales bovines [342] et sur la surface cellulaire de cellules endothéliales humaines [343] dans le plasma circulant [344] et dans les cardiomyocytes [345].

Cette enzyme a été proposée comme source de radicaux libres dans les tissus reperfusés, en particulier, dans les tissus cardiaques. Dans le tissu ischémique, l'ATP est catabolisé en hypoxanthine qui s'accumule. Des conditions ischémiques augmentent aussi la concentration de xanthine oxydase par un mécanisme impliquant le calcium et certaines protéases. Lors de la reperfusion, les niveaux élevés de xanthine et xanthine oxydase produisent une augmentation brusque de la production d'anion superoxyde [346-348].

Des études ont rapportées une augmentation de l'activité de l'enzyme dans des cas d'insuffisance cardiaque [349] et l'allopurinol peut augmenter l'efficacité contractile d'un cœur en défaillance [350]. L'importance du rôle de la xanthine oxydase dans le tissu cardiaque est cependant parfois remise en question à cause de la faible activité de l'enzyme dans le tissu [351]. Une étude a même rapporté que la xanthine oxydase n'était pas exprimée à un niveau détectable dans les cellules musculaires cardiaques humaines

[352]. La xanthine oxydase a aussi été impliquée dans la maladie vasculaire bien que souvent perçue comme un facteur favorisant l'adhésion des neutrophiles plutôt qu'un facteur primaire de dommages cellulaires [353]. Il a été néanmoins démontré, par l'action d'inhibiteurs, que la xanthine oxydase produisait de l'anion superoxyde dans le réseau vasculaire humain et que ce traitement améliorait la vasodilatation chez des patients hypercholestérolémiques [354, 355].

4.2.2.6 La NAD(P)H oxydase

D'abord identifiée pour son implication dans la réponse immunitaire par les neutrophiles et les autres cellules phagocytaires, la NAD(P)H oxydase est une enzyme capable de produire l'anion superoxyde à partir de la NADH et de la NAD(P)H [356]. L'anion superoxyde, bien connu comme médiateur de l'inflammation du recrutement cellulaire et comme inducteur de l'apoptose a d'abord été étudié pour son rôle dans le système immunitaire. Cependant, la NAD(P)H oxydase a récemment reçu une attention considérable des chercheurs du domaine cardiovasculaire suite à la découverte des propriétés de l'angiotensine II pour stimuler la NAD(P)H oxydase dans les cellules de muscles lisses vasculaires [357] et dans l'aorte de lapin [358]. Ces résultats ont ensuite été confirmés par la mesure de l'expression des différentes sous-unités de la NAD(P)H oxydase dans les tissus cardiovasculaires [359]. Bien que la NAD(P)H oxydase ne soit pas l'unique source de radicaux dans le réseau vasculaire, les connaissances actuelles suggèrent que la NAD(P)H oxydase est la source principale d'anion superoxyde impliqué

dans le développement de l'athérosclérose par rapport aux autres sources d'anion superoxyde connues [360].

4.2.2.6.1 La composition de la NAD(P)H oxydase

La NAD(P)H oxydase est une enzyme composée de sous-unités multiples qui, lorsque activées, s'assemblent à la membrane cellulaire pour produire l'anion superoxyde. La NAD(P)H oxydase a cependant aussi été associée à la production de radicaux libres dans les mitochondries [361]. Deux sous-unités connues sont localisées à la membrane : la gp91phox (sept homologues ont été identifiés) et la p22phox. Les autres sous-unités sont situées dans le cytoplasme : la p47phox, p67 phox, p40phox et la protéine G rac [362-364]. Phox signifie *phagocytic oxidase*, un vestige de la fonction originalement associée à l'enzyme. Les homologues de la gp91phox sont aussi nommés Nox1-5 and Duox1-2 et leur expression dans le système cardiovasculaire varie dépendamment des tissus impliqués mais Nox4 semble être le plus abondante avec Nox1 et Nox2 [365]. Malgré les similitudes structurelles entre les différentes sous-unités exprimées dans le système immunitaire et cardiovasculaire, l'enzyme présente une expression et une activité moins importante dans les tissus cardiovasculaires [366]. Une autre différence est l'activité constitutive de l'enzyme observée dans le système cardiovasculaire comparativement à une activité induite dans le système immunitaire; une situation semblable aux différents types de NOS dans le système vasculaire et immunitaire [367]. La NAD(P)H oxydase dans les cellules cardiovasculaires régule des fonctions cellulaires de base comme la croissance cellulaire, le remodelage vasculaire et même le tonus vasculaire [368].

4.2.2.6.2 La NAD(P)H oxydase dans le système cardiovasculaire

La stimulation hormonale par le système rénine-angiotensine est probablement le mécanisme de stimulation de l'activité NAD(P)H oxydase le mieux caractérisé. Puisque l'activation du système rénine-angiotensine est associé aux maladies cardiovasculaires, il a été proposé que les effets délétères de l'angiotensine II soient causés par la NAD(P)H oxydase. Jusqu'à présent, les expériences avec un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase (apocynine) ont montré que le remodelage des vaisseaux de la souris par l'angiotensine II est dépendant de l'activité NAD(P)H oxydase [369]. D'autres peptides produits en réponse à l'activation du système rénine-angiotensine tels que l'aldostérone [370] et l'endothéline [371-373] augmentent l'activité de la NAD(P)H oxydase dans certains modèles d'hypertension. Aussi, une surexpression de cette enzyme a été rapportée chez les rats spontanément hypertendus (SHR) [374].

Une suractivation de la NAD(P)H oxydase a été observée dans l'hyperinsulinémie et le diabète puisque le méthylglyoxal, un produit de la glycolyse, et le glucose peuvent activer cette enzyme dans les cellules endothéliales et de muscles lisses vasculaires de bœuf et de rat [375, 376]. La transactivation du récepteur des facteurs de croissance à l'insuline IGF-1R par l'angiotensine II est impliquée dans la surproduction vasculaire d'espèces radicalaires de l'oxygène dans le développement de l'hypertension dans les rats SHR [372]. Le diabète et l'hypertension ont été associés à une augmentation de l'activité ou de l'expression de la NAD(P)H oxydase dans des modèles expérimentaux et chez l'humain [377-380]. D'autres récepteurs de facteurs de croissance sont aussi susceptibles

d'être impliqués puisqu'une étude a décrit une activation de la NAD(P)H oxydase par le TGF-beta1 suivie d'une production de VEGF et d'anion superoxyde [381]. Parmi d'autres activateurs, les forces de cisaillements ont aussi été identifiées comme un facteur activateur potentiel de la NAD(P)H oxydase dans les cellules endothéliales de souris [382].

En plus des facteurs stimulateurs, plusieurs modulateurs et inhibiteurs de l'activité de la NAD(P)H oxydase ont été identifiés à l'aide de modèles animaux. Les statines (atorvastatine) [383], les modulateurs de récepteurs à œstrogènes [384], les inhibiteurs de la voie ERK/MAPK [385, 386] ou de la voie p38 (dans les tissus rénaux) [387], les inhibiteurs de cyclooxygénases [265], des inhibiteurs des Rho-kinases (fasudil) [265, 388], des modulateurs de récepteurs B2 de la bradykinine (kallikréine) [389], la *uncoupling protein 2* dans les cellules de muscles lisses vasculaires traitées à l'angiotensine II et au glucose [372, 390] et l'adrénomédulline dans les cellules endothéliales stimulées par l'angiotensine II [378] ont tous été suggérés comme inhibiteurs potentiels de la NAD(P)H oxydase.

La complexité de la signalisation de la NAD(P)H oxydase est augmentée par le produit même de l'enzyme, l'anion superoxyde et les radicaux associés à sa dégradation. Ces radicaux sont des molécules polyvalentes de signalisation capables d'activer des voies cellulaires souvent situées en amont de l'activation de la NAD(P)H oxydase. L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène activent les voies tyrosine kinase [215] et les processus dépendants de ces réactions comme l'activation de la Src ou des différentes

MAPK qui renforcent l'activité NAD(P)H oxydase. Une rétroaction positive a été suggérée et supportée par deux études [231, 386].

4.2.2.6.3 La stimulation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II

L'activation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II a fait l'objet de plusieurs études depuis sa découverte. La transactivation des récepteurs des facteurs de croissance et l'activation de la protéine Src ont été identifiées comme des composantes clés de l'activation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II à court (5-15 minutes) et à long terme (6-24h) puisqu'un inhibiteur de la Src, le PP2, a pu atténuer la génération de l'anion superoxyde par l'angiotensine II [231, 391]. De plus, il a été rapporté qu'un inhibiteur et un ARNm dominant négatif de rac, un inhibiteur de la PI3-kinase ou un inhibiteur de la translocation des récepteurs du facteur endothélial de croissance (EGFR) empêchait l'activation à court terme de la NAD(P)H oxydase [231, 391]. De plus, la protéine kinase C (PKC) a également été suggérée comme une étape importante dans l'activation directe de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II puisque la PKC peut phosphoryler la sous-unité p47phox de la NAD(P)H oxydase et amorcer l'assemblage du complexe enzymatique à la membrane cellulaire. Cette implication de la PKC a d'abord été démontrée dans l'aorte thoracique en utilisant la calphostine C, un inhibiteur de la PKC, dans les vaisseaux isolés des rats 2K 1C (modèle Goldblatt) [392]. La transactivation des facteurs de croissance et l'activation de la c-Src et de la PKC sont considérées comme les voies principales responsables de la stimulation par la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II [393].

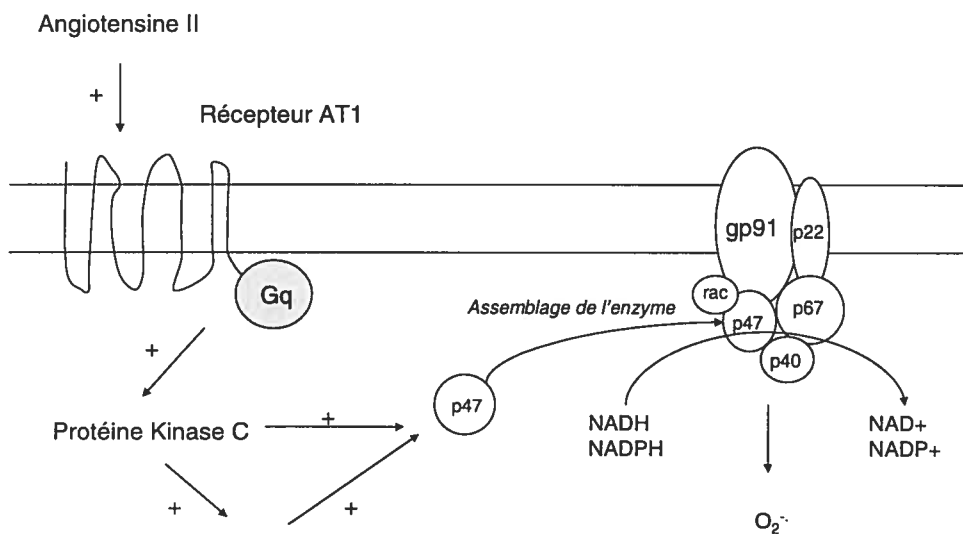


Figure 19 : La stimulation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II.

Une autre étude a démontré l'importance de l'activation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II en utilisant une souris déficiente pour le gène de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase. Cette enzyme régule la production du NAD(P)H sous forme réduite. La réduction de ce substrat de la NAD(P)H oxydase n'affecte pas la pression artérielle basale des animaux, mais prévient en partie l'augmentation de la pression par l'angiotensine II [394]. Un autre exemple de rôle fonctionnel joué par la NAD(P)H oxydase dans la signalisation de l'angiotensine II est la stimulation de l'activité sympathique des nerfs rénaux par la stimulation de la NAD(P)H oxydase [395].

Les mécanismes menant à l'activation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II varient de façon importante dépendamment des temps de traitement. Des études ont révélé des pics biphasiques de production d'anion superoxyde a différents temps et une décroissance marquée de la production d'anion superoxyde initiale après 3 heures montrant que l'activation de la Src et de la PKC n'étaient pas suffisantes pour assurer une production soutenue de l'anion superoxyde [231, 373]. En fait, les mécanismes moléculaires de l'activation de la NAD(P)H oxydase semblent modifiés suite à une exposition prolongée à l'angiotensine II et font appel à des voies de signalisation différentes.

4.2.2.6.4 L'endothéline et la NAD(P)H oxydase

L'angiotensine II peut augmenter la synthèse de l'endothéline-1 dans les tissus cardiovasculaires par l'activation de la voie ERK-MAPK [84, 396]. De plus, dans une étude dans laquelle des rats ont été traités avec le bosentan, un antagoniste des deux sous-types de récepteurs de l'endothéline, les effets hémodynamiques de l'angiotensine II ont été prévenus [397]. Ces études suggèrent que les effets physiologiques de l'angiotensine II, incluant la production de l'anion superoxyde, sont probablement causés par cette production d'endothéline.

Comme l'angiotensine II, l'endothéline-1 est un stimulant puissant de la production d'anion superoxyde [398]. Cependant, la source de l'anion superoxyde reste indéfinie. Une étude a montré que les mitochondries peuvent être impliquées pour cette production

dans les cellules de muscles lisses vasculaires [399]. Des études récentes ont montré que l'endothéline peut activer la NAD(P)H oxydase *in vivo* [400-402] et que les radicaux libres générés par ce mécanisme pouvaient jouer des rôles importants dans un modèle d'hypertension chez le rat induite par la désoxycorticostérone et un régime élevé en sel (DOCA-sel) [371]. En effet, dans ce modèle de rat, on observe une augmentation des niveaux d'endothéline-1 dans les homogénats d'artère carotide et un antagoniste sélectif des récepteurs ETA, le ABT-617, peut prévenir l'augmentation d'anion superoxyde dans ce tissu. L'apocynine, un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase, prévient aussi l'augmentation de la production d'anion superoxyde ce qui suggère un rôle dominant de la NAD(P)H oxydase dans la génération d'anion superoxyde dans ce modèle.

L'endothéline-1 active aussi la NAD(P)H oxydase et la production d'anion superoxyde dans les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine [403]. Une autre étude a montré l'implication d'une voie reliant les récepteurs à endothéline à l'activité et l'expression de la NAD(P)H oxydase [404]. La source majeure d'anion superoxyde produite par l'endothéline-1 chez la souris est la NAD(P)H oxydase [405].

La NAD(P)H oxydase est donc une des sources principales d'anion superoxyde dans le système cardiovasculaire et est stimulée par des voies de signalisation associées à la maladies cardiovasculaire, particulièrement des voies impliquant des récepteurs couplés aux protéines Gq.

4.3 Les dommages moléculaires causés par le stress oxydant

Il est difficile de décrire l'ensemble des réactions impliquant des radicaux et des espèces réactives dérivées de l'oxygène dans un organisme vivant. La réactivité de ces espèces leur confère des possibilités considérables, cependant certaines de ces réactions sont bien connues et souvent associées aux pathologies du système cardiovasculaire.

La réaction entre un radical et la molécule cible peut être spontanée, mais aussi peut être favorisée ou même faire partie d'un système enzymatique existant. Par exemple, la myéloperoxydase, une enzyme des neutrophiles, utilise l'anion superoxyde [406] ou le peroxyde d'hydrogène [407] comme substrat pour oxyder des molécules. Il faut cependant distinguer les réactions d'oxydation causées par des systèmes enzymatiques et les réactions d'oxydation spontanées. Un système enzymatique tend à produire des réactions uniformes et joue souvent un rôle précis dans le fonctionnement cellulaire. Les réactions spontanées produisent une grande diversité de molécules souvent toxiques.

4.3.1 La peroxydation des lipides

L'oxydation des lipides est un phénomène depuis longtemps décrit et bien connu. Depuis l'antiquité, la dégradation de l'huile ou rancidité, en particulier dans le cas de l'huile d'olive, a toujours été un problème. Un chimiste Suisse, Nicholas-Théodore de Saussure, a rapporté qu'une couche d'huile de noix est capable d'absorber 150 fois son poids en

oxygène. Suite à ce changement, l'huile devenait visqueuse et dégageait une mauvaise odeur [408].

L'oxydation la plus commune des lipides *in vivo* est l'hydroperoxydation [409]. Les hydroperoxydes sont des dérivés des acides gras libres, du cholestérol, des esters du cholestérol, des phospholipides et glycolipides. Il est à noter que les chaînes d'acides gras saturées sont beaucoup moins susceptibles à l'hydroperoxydation que les acides gras insaturés. Règle générale, les insaturations diminuent la stabilité d'un lipide face à la lumière, la chaleur et à l'oxygène. L'hydroperoxydation des lipides est aussi une composante essentielle de la formation de molécules de signalisation par les cyclooxygénases ou les lipoxygénases. Cependant, les hydroperoxydes formés spontanément hors de ces processus enzymatiques sont susceptibles de former différents produits de dégradations toxiques. Par exemple, des alcanes gazeux sont produits par la scission du lien carbone adjacent au groupe hydroperoxyde [410] (figure 20).

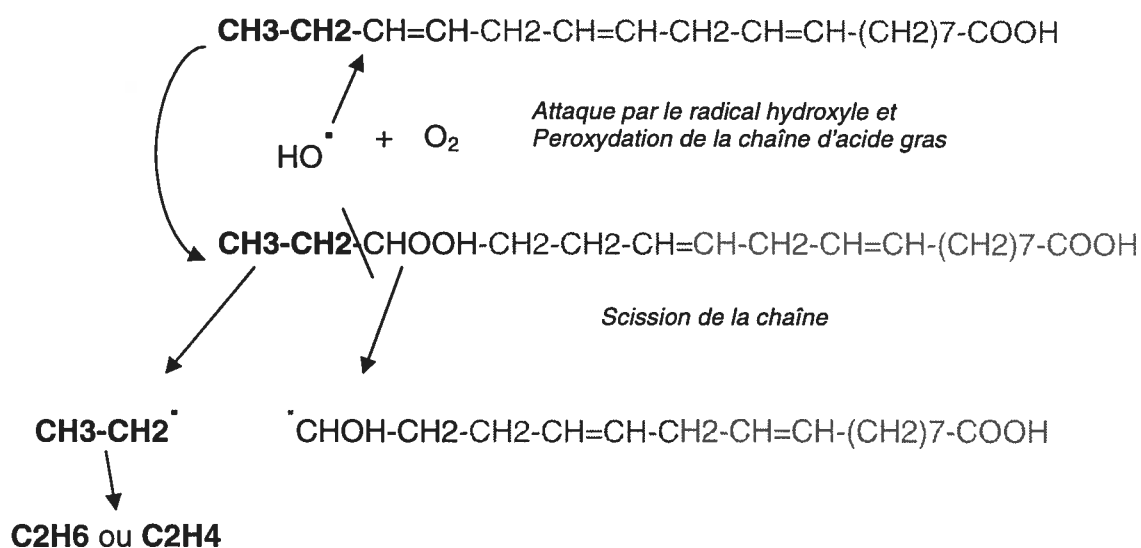


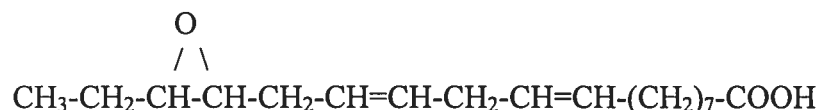
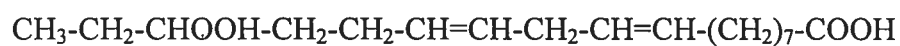
Figure 20 : Oxydation de l'acide α -linoléique et formation d'éthane ou d'éthylène

Les radicaux alkyles produits comme intermédiaires de ces réactions de scission sont aussi susceptibles de former des aldéhydes sous l'action du radical hydroxyle :



Un aldéhyde particulièrement bien connu est le 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal (4-HNE) qui est formé à partir de l'acide arachidonique et linoléique et qui à faible concentration active les guanylates cyclases et à concentration plus élevée bloque la synthèse d'ADN [411]. Une série d'oxydation et de clivages peut aussi produire le malondialdéhyde (MDA) $\text{HOC}-\text{CH}_2-\text{COH}$ souvent utilisé comme marqueur du stress oxydant.

Après peroxydation il peut aussi y avoir formation d'époxydes comme la formation d'EET par le cytochrome p450.



Malgré que certains de ces composés soient produits de façon endogène par des enzymes, la plupart sont toxiques [412].

La formation spontanée relativement désordonnée des intermédiaires d'oxydation des lipides est un stimulant pour les maladies inflammatoires. Dans les vaisseaux une des agressions chimiques causées par le radical hydroxyle la mieux connue serait l'oxydation du cholestérol et des acides gras qui favoriserait leur liaison aux parois vasculaires [413]. Il est intéressant de noter que les acides gras saturés sont chimiquement beaucoup plus

stables que les acides gras insaturés et aussi beaucoup moins susceptibles d'être oxydés. Selon cette conception, les acides gras insaturés seraient donc plus dangereux dans l'environnement direct vasculaire que les acides gras saturés. Par ailleurs, 50% du contenu lipidique des LDL sont des acides gras polyinsaturés, particulièrement de l'acide linoléique [414]. Cette hypothèse n'a cependant jamais été démontrée, appuyée ou explorée sérieusement dans un modèle vivant probablement puisque les graisses saturées augmentent les LDL circulants et sont donc considérées comme étant plus nocives pour le système circulatoire que les graisses insaturées.

4.3.2 L'oxydation des protéines

Les protéines sont susceptibles à l'oxydation sur plusieurs sites. Les protéines sont aussi vulnérables principalement parce qu'elles sont présentes en grande concentration dans les milieux biologiques comparativement aux autres espèces moléculaires. Une molécule de LDL renferme 4535 acides aminés pour environ 3000 molécules de lipides. La complexité des réactions et l'absence relative de marqueurs fiables de l'oxydation des protéines font en sorte que ces réactions sont souvent négligées dans l'étude du stress oxydant [415].

L'oxydation des protéines en présence d'oxygène, en excluant les réactions sur les groupements spécifiques des différents acides aminés, se fait principalement par le radical hydroxyle sur le carbone entre la fonction acide et amine ou sur le premier carbone de la chaîne du groupement fonctionnel de l'acide aminé [416]. Les carbonés

ayant un électron libre peuvent ensuite former des hydroperoxydes ou d'autres radicaux (figure 21).

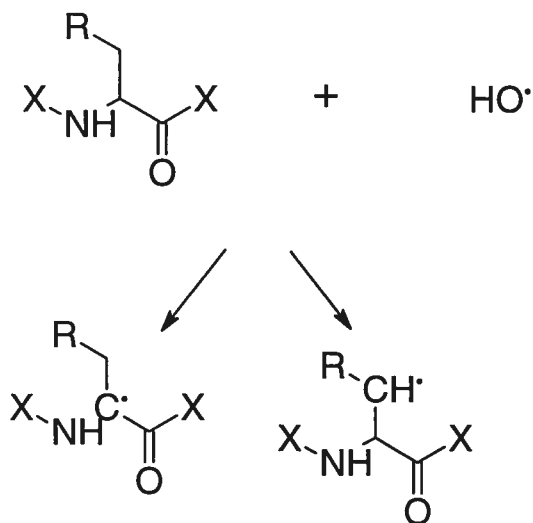
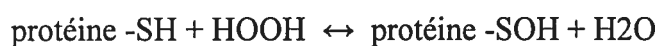


Figure 21 : Attaque du radical hydroxyle sur un acide aminé

Les groupes fonctionnels des acides aminés peuvent aussi subir des réactions avec des radicaux libres capables de modifier leur nature. La phénylalanine par exemple peut être modifiée en ortho ou meta-tyrosine [417]. Les groupements sulfhydryls (SH) sur les cystéines ont été décrits comme étant des sites privilégiés d'oxydation souvent ciblés de façon relativement spécifique par l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène [418]. La S-thiolation serait une sorte de tampon capable d'absorber un afflux de molécules oxydantes, surtout le peroxyde d'hydrogène, puisque la réaction est réversible dans un échantillon de sang quelques heures après le stress initial [419].



Cette réaction rapide et réversible nécessite un stress oxydant significatif avant de se produire [420] puisque moins de 1% des protéines sont oxydées à l'état physiologique basal [421, 422]. Les protéines impliquées sont souvent celles qui sont le plus exprimées : l'actine [421], l'anhydrase carbonique [422] ou la glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogénase [420]. Ce système serait une sorte de tampon capable d'absorber un excès de peroxyde d'hydrogène. La réversibilité du système et sa capacité d'oxyder le glutathion et de produire d'autres intermédiaires oxydants compliquent considérablement la mesure du peroxyde dans des tissus vivants bien que les implications physiologiques de ce système n'aient jamais vraiment été évaluées. La S-thiolation a aussi été souligné dans les monocytes humains [423]. Il a été démontré que les propriétés anti-oxydantes d'une protéine des HDL appelée PON1 étaient directement reliées à la quantité de groupes sulfhydryls libres sur la protéine. Les PON1 purifiées à partir de matériel prélevé chez de jeunes patients avaient une proportion de groupes sulfhydryls plus importante que chez de vieux patients [45]. En plus de cet effet, la modification des cystéines entraîne des impacts importants sur la signalisation cellulaires, en particulier pour les voies tyrosines/cystéine kinases ou phosphatases [418].

Les rôles physiologiques des modifications radicalaires des protéines restent à démontrer. Cependant, l'oxydation des protéines peut jouer un rôle de réorganisation enzymatique chez certaines bactéries [424] ce qui laisse croire que cette hypothèse est peut-être valide. Il reste cependant que la plupart des modifications des protéines sont reliées à l'inactivation et la dégradation de systèmes enzymatiques et sont des marqueurs de pathologies ou du vieillissement des tissus chez l'homme.

4.3.3 L'oxydation des glucides

Le glucose peut aussi former des intermédiaires par des réactions d'oxydation avec des radicaux. Deux produits du glucose, le méthylglyoxal et l'arabinose peuvent modifier les lysines ou établir des liens entre les protéines (*cross-links*) [425, 426]. Ces liens sucres-protéines sont appelés des réactions de Maillard ou brunissement (*browning*) et sont analogues aux réactions chimiques produites lors de la formation du caramel avec le lait et le sucre ou du pain rôti avec l'amidon et les protéines du blé.

Le méthylglyoxal est un aldéhyde produit par l'oxydation du glucose, de l'allose, du galactose ou du ribose considéré comme un produit avancé de glycation. Il peut être aussi formé à partir de l'acétone produit à partir des lipides ou de l'aminocétone produit à partir des acides aminés glycine et thréonine (figure 22) [427].

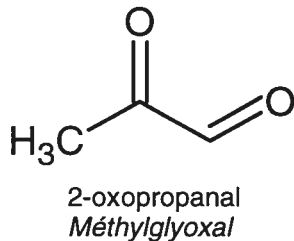


Figure 22 : Structure du méthylglyoxal

Les concentrations plasmatiques de méthylglyoxal augmentent de 5-6 fois chez les patients diabétiques de type 1 et de 2-3 fois chez les patient diabétiques de type 2 [428]. Selon une étude récente, le méthylglyoxal stimule la production d'anion superoxyde par l'activation de la NAD(P)H oxydase [429]. Finalement, l'oxydation du désoxyribose est le principal mécanisme par lequel l'ADN est endommagé par le stress oxydant.

4.4 Les systèmes antioxydants

Un antioxydant est une molécule qui, à l'état de traces, est capable d'éliminer ou de désactiver une grande quantité de radicaux et de prévenir leurs effets sur les biomolécules. À hautes concentrations, presque toutes les molécules peuvent être considérées comme antioxydantes puisque la propriété majeure des radicaux est justement de pouvoir réagir avec un grand nombre de molécules sans discrimination. Pour qu'un antioxydant ait une quelconque utilité pratique, il doit pouvoir exercer un effet dans un système vivant à des concentrations qui sont physiologiquement possibles et tolérables. Par contre, après réaction avec une espèce réactive, une molécule devient oxydée (ou réduite) et perd sa capacité protectrice. Certaines molécules ont plusieurs sites d'oxydation ce qui leur permet de désactiver plusieurs espèces réactives avant de perdre leur efficacité alors que d'autres font partie de systèmes, souvent enzymatiques, capables de régénérer les espèces antioxydantes. Il faut aussi faire la distinction entre les systèmes capables de neutraliser les radicaux ou les espèces réactives non radicalaires. Un radical réagissant avec une molécule non radicalaire va forcément produire un autre radical ce qui engendre souvent une chaîne de réactions. Pour se débarrasser d'un radical il faut souvent la présence d'un autre radical pour que les deux électrons libres forment un lien covalent; stratégie employée par la superoxyde dismutase avec l'anion superoxyde. Finalement, les sites d'action des antioxydants doivent correspondre aux sites de production des radicaux puisque ces derniers sont souvent trop réactifs pour diffuser très loin de leurs sites de production.

4.4.1 Le cycle des vitamines

La vitamine E est par sa structure hydrophobe, un antioxydant membranaire liposoluble important. Une simulation a révélé que la vitamine E contribue pour 30% de la réduction de la susceptibilité des LDL à l'oxydation [430]. La vitamine E, ou l' α -tocophérol, peut céder un hydrogène pour réagir avec un lipide peroxydé radicalaire ou même directement avec le radical hydroxyle [431-433]. Cette réaction forme cependant un radical α -tocophéroxyle qui est d'une relative stabilité pour un radical.



Plusieurs hypothèses sur l'inactivation du radical tocophéroxyle existent. Deux tocophéroxyles peuvent réagir par dismutation pour former un produit non-radicalaire, l' α -tocophérylquinone [434]. La vitamine C a aussi été suggérée comme réducteur pour régénérer la vitamine E [435]. Le glutathion et le mécanisme de régénération du glutathion ont aussi été décrits comme mécanismes possibles de la régénération de la vitamine E [436]. D'autres substances, parfois exogènes, peuvent favoriser la régénération des vitamines. L'acide α -lipoïque, par exemple, est une substance capable de convertir l'acide déhydroascorbique en ascorbate (vitamine C) [437].

4.4.1.1 L'oxydation des vitamines

La vitamine C est un antioxydant capable de neutraliser des radicaux libres dans le plasma humain et de prévenir la peroxidation des lipides tout en augmentant les défenses antioxydantes de l'organisme [438-440]. Le mécanisme de neutralisation probable est une réaction d'une espèce réactive avec un hydrogène de l'acide ascorbique pour former de l'acide déhydroascorbique, une forme chimique stable et relativement inoffensive (Figure 23). L'acide déhydroascorbique peut même être régénérée en acide ascorbique par des protéines disulfides isomérases du réticulum endoplasmique. Un mécanisme semblable a aussi été proposé pour la vitamine E (α -tocophérol) bien que l'exactitude de cette théorie reste encore à démontrer.

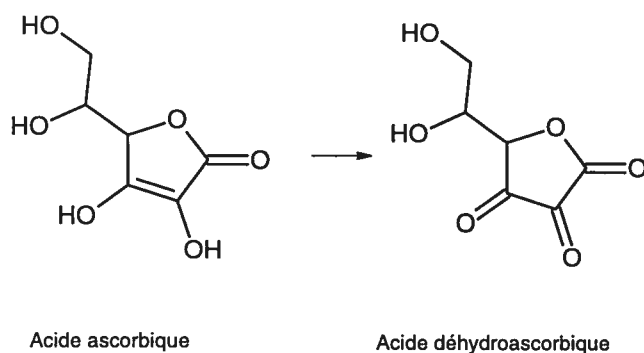
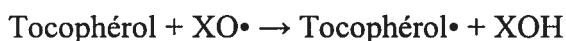
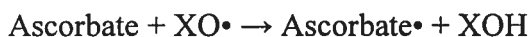


Figure 23 : Oxydation de l'acide ascorbique

L'électron libre des radicaux demeure toutefois actif et peut aussi réagir avec les vitamines les transformant elles-mêmes en radicaux (table 1) [330]. Ces radicaux ont un potentiel réducteur faible, mais tout de même suffisant pour réagir de façon similaire avec des molécules biologiques surtout à concentration élevée.



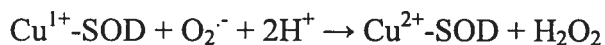
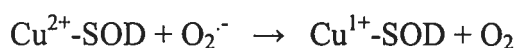
Autre phénomène possible est l'autooxydation des vitamines souvent associée à une surdose. À 10^{-5}M et à pH 7,4 sous conditions aérobiques, l'acide ascorbique s'autooxyde en acide déhydroascorbique au rythme de $1,16 \text{ umol/min/L}$ [441]. Ces réactions ne produisent pas de radicaux en tant que tels, mais en présence d'ions métalliques libres comme le cuivre, la vitamine C peut produire des radicaux hydroxyles [442].

L'administration exogène de vitamine C ou E à fortes doses chez des patients, souvent dans le cadre d'un traitement antioxydant, serait potentiellement une source additionnelle d'espèces réactives et de radicaux.

4.4.2 La superoxyde dismutase

La toxicité de l'anion superoxyde contraint les organismes vivant en présence d'oxygène à se protéger à l'aide de systèmes antioxydants. Un de ces systèmes parmi les mieux connus est la superoxyde dismutase (SOD). La SOD est un système enzymatique très efficace capable d'inactiver l'anion superoxyde au fur et à mesure de sa diffusion. Des souris ayant des gènes inactivés de la SOD ont une espérance de vie fortement réduite. Il existe plusieurs variantes des SOD, par exemple, la SOD mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur alors que la SOD cytoplasmique utilise le cuivre et le zinc.

L'enzyme SOD dégrade sélectivement l'anion superoxyde selon la réaction :



Cette réaction combine 2 radicaux qui s'annulent mutuellement pour produire du peroxyde d'hydrogène. Cette réaction permet d'éliminer le radical et le peroxyde d'hydrogène peut ensuite être pris en charge par les autres systèmes antioxydants de l'organisme.

La quantité d'anions superoxydes actifs dans les milieux biologiques est souvent le résultat entre l'équilibre des enzymes productrices de radicaux et des enzymes antioxydantes. Par exemple, l'angiotensine II et l'isoprotérénol (un agoniste β -adrénergique), stimulent l'activité et l'expression de la NAD(P)H oxydase dans les cardiomyocytes [443]. Par contre, l'angiotensine II inhibe l'activité de la SOD alors que l'isoprotérénol stimule cette activité, mais inhibe l'activité de la catalase [444]. Bien que les deux stimulations activent la voie NAD(P)H oxydase, la modulation différente des enzymes antioxydantes mène à une accumulation de radicaux différents, l'anion superoxyde pour l'angiotensine II [357] et le peroxyde d'hydrogène pour l'isoprotérénol [445].

4.4.3 La catalase et la glutathion peroxydase

Le peroxyde d'hydrogène est dégradé par la catalase et du glutathion peroxydase (GPx) [446]. La GPx est localisée dans les mitochondries, le cytosol et les érythrocytes et réduit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes des lipides avec le glutathion [447]. L'enzyme est une glycoprotéine tétramérique qui utilise le sélénium comme cofacteur pour exercer ses effets antioxydants. La GPx converti les peroxydes en alcool en cédant un atome d'hydrogène et en formant un lien disulfure avec deux molécules de glutathion (GSH) :

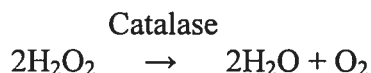


La régénération du glutathion est possible avec une molécule de NADPH :



La N-acétylcystéine, un dérivé de la L-cystéine, est un précurseur du glutathion et est souvent utilisée comme antioxydant par exemple lors de surdose de paracétamol (tylénol) où il y a déplétion de glutathion [448].

La catalase est principalement localisée dans les peroxysomes et dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau. Cette enzyme est aussi un tétramère avec des noyaux hèmes contenant des ions ferriques. Une unité de catalase peut dégrader 5 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène à la minute.



La GPx semble mieux adaptée pour dégrader la production basale de peroxyde d'hydrogène alors que la catalase, avec un Km plus élevé, est davantage impliquée dans la dégradation de plus grandes quantités [446].

4.5 Le stress oxydant en clinique

Le lien entre le stress oxydant et la maladie cardiovasculaire chez l'humain est bien appuyé par des études identifiant la présence de marqueurs d'oxydation et de radicaux en quantité plus importante chez les patients malades. Par exemple, chez des patients souffrant d'hypertension essentielle, le taux plasmatique de peroxyde d'hydrogène augmente [449]. L'association entre le stress oxydant et la maladie cardiovasculaire est reconnue, mais le principal problème est de développer un consensus sur le rôle joué par le stress oxydant dans le développement et le maintien des maladies cardiovasculaires et de trouver des arguments convaincants pour l'utilisation de thérapies visant de façon spécifique les radicaux ou leurs systèmes de production. En thérapeutique, les traitements avec les antioxydants n'ont pas donné les résultats escomptés et sont marginalisés pour diverses raisons.

Une généralisation excessive des composés sous la rubrique 'antioxydants' est néfaste pour identifier des composés utiles en clinique. En effet, chaque antioxydant cible souvent une catégorie spécifique d'espèces réactives, possède un site d'action particulier,

est efficace à des concentrations précises et forme des interactions avec les biomolécules de l'organisme. Par exemple, les vitamines aident à régénérer le glutathion et sont utiles pour neutraliser les composés peroxydés, mais sont converties elles-mêmes en radicaux sous l'effet des radicaux ou des ions métalliques. À haute concentration, les vitamines s'autooxydent et perdent leur efficacité.

Ensuite, beaucoup de substances naturelles possèdent des propriétés antioxydantes, ce qui rend leur commercialisation peu intéressante et leur étude peu rentable. La synthèse *de novo* d'antioxydants est limitée par le manque de données et de connaissances sur les formes chimiques efficaces et les contextes thérapeutiques favorables. Un autre problème est que le traitement antioxydant est probablement déjà présent dans la thérapie actuelle, bien que souvent à l'insu des médecins et patients. En effet, presque toutes les grandes classes de médicaments antihypertenseurs ont des effets antioxydants. Les bêta-bloqueurs préviendraient la peroxydation des lipides [450], les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, en particulier le captopril, peut empêcher la formation de l'anion superoxyde en chélatant le cuivre [451] ou en bloquant l'activation de l'enzyme NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II, les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II ont un effet similaire sur la NAD(P)H oxydase et augmentent la neutralisation des radicaux dans les leucocytes [452], les antagonistes du calcium de type dihydropyridine augmentent la concentration et l'activité de la superoxyde dismutase [453], les statines ont des propriétés antioxydantes auxquelles sont attribués des effets bénéfiques sur la prévention de l'athérosclérose indépendants de leurs effets sur la balance lipidique sanguine [454] et l'aspirine est capable de diminuer la production de

l'anion superoxyde dans des modèles de rats hypertendus [261, 262]. L'ajout d'une thérapie antioxydante aux traitements existants a donc moins de chances de procurer des bénéfices additionnels.

Les vitamines ont été suggérées comme traitement pour la prévention de maladies cardiovasculaires, en particulier les vitamines C et E. Par exemple, la vitamine C a amélioré chez des patients souffrant d'hypertension artérielle la vasodilatation brachiale induite par l'acétylcholine mais n'a pas modifié la vasodilatation induite par le nitroprussiate de sodium [455]. La vitamine C serait donc un chélateur de l'anion superoxyde et protégerait la fonction endothéliale en augmentant la disponibilité du NO.

Une revue des études cliniques utilisant les vitamines A, C et E en 1995 montre que les sous-groupes de patients qui prenaient des suppléments de vitamines présentaient moins de risques cardiovasculaires que la moyenne. Toutefois, ces groupes de patients adoptaient généralement des habitudes de vie plus saines ce qui pouvait induire un biais dans les conclusions sur les effets bénéfiques de la supplémentation en vitamines. En contraste, les études randomisées sur ce sujet, bien que la plupart ne s'intéressaient pas directement à la maladie cardiovasculaire, n'ont pas montré d'effet préventif associé aux vitamines C, E et au bêta-carotène. Ces résultats négatifs ont été attribués aux doses insuffisantes et au temps de traitement trop court, mais ont motivé l'élaboration d'études cliniques à large échelle pour vérifier la pertinence d'utiliser les vitamines dans le traitement des maladies cardiovasculaires [456].

L'étude *Cambridge Heart AntiOxidant Study* (CHAOS) est une étude de prévention secondaire de 520 jours sur 2000 patient de 55 ans et plus ayant subi une angioplastie ont reçu soit de l'huile de soya en placebo ou de la vitamine E (266 et 533 mg). Les infarctus non-fatals du myocarde ont été significativement diminués de 75% dans le groupe vitamine E, mais la mortalité cardiovasculaire totale a été augmentée non-significativement dans le groupe vitamine E dans les 200 premiers jours de l'étude ce qui a alimenté d'intenses débats lors de la publication de ces résultats et une remise en question de l'utilisation des vitamines [457].

Les grandes études qui ont suivi ont donné des résultats décevant pour les vitamines.

L'étude *Heart Outcomes Prevention Evaluation* (HOPE) a suivi environ 10 000 patients à haut risque d'événement cardiovasculaire sur 4,5 ans. Dans cette étude, les sujets qui ont reçu de la vitamine E ou C n'ont pas vu leurs risques diminuer comparativement aux patients recevant des placebos. Il semble peu probable que les vitamines aient un effet protecteur dans ce contexte [458]. L'étude *Women Health Study* dans laquelle 40 000 femmes de 45 ans et plus reçoivent des doses de beta-carotène (50 mg) et de vitamine E (600 mg) est présentement en cours et donneront des détails additionnels sur l'utilité d'un traitement avec la vitamine E [459].

L'usage de vitamines n'est probablement pas une stratégie clinique efficace pour contrer l'augmentation de la production de radicaux observée chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires. Les vitamines sont essentiellement des cofacteurs de la réserve antioxydante physiologique, par exemple de la glutathion peroxydase; réserve

antioxydante dont l'expression et l'activité est souvent déjà diminuée chez les patients hypertendus. Les vitamines peuvent améliorer, mais ne peuvent remplacer les enzymes de la réserve antioxydante. Aussi, les vitamines sont inefficaces à faibles concentrations pour causer un effet antioxydant significatif, mais s'autooxydent à forte concentration ce qui diminue leur potentiel antioxydant. Finalement, les produits de réaction des vitamines avec les radicaux sont radicalaires et ont un potentiel réactif faible, mais significatif à hautes concentrations.

5. Les acides gras oméga-3 et 6 et la maladie cardiovasculaire

L'hypothèse du rôle protecteur des acides gras oméga-3 contre les maladies cardiovasculaires a pour origine de simples observations épidémiologiques faites dans les années 70 entre les populations Inuits et Danoises du Groenland et leurs alimentations respectives. Les Inuits consomment de vastes quantités de matières grasses et d'oméga-3. Le taux de maladies cardiovasculaires est très faible dans cette population comparativement aux danois pour un mode de vie similaire [460]. Les premières hypothèses sur les mécanismes protecteurs des acides gras oméga-3 ont mis principalement en cause les taux de HDL et de LDL (high/low density lipoproteins) dans la circulation sanguine. Une consommation élevée d'acides gras saturés favoriserait une augmentation des LDL [461] par rapport à une alimentation riche en graisses mono ou polyinsaturés.

Les oméga sont des acides gras insaturés dont la position de l'insaturation détermine la nomenclature. Par exemple, des oméga 3 possèdent une insaturation sur le troisième carbone à partir de la queue de la chaîne. Les oméga 6 possèdent une insaturation sur le sixième carbone, les oméga 9 sur le neuvième et ainsi de suite. Les oméga 3 et 6 sont des graisses dites essentielles car les espèces animales ne possèdent pas la machinerie enzymatique pour insérer des doubles liens en dessous du 7^{ième} carbone de la chaîne terminale. On retrouve les oméga 3 et 6 dans la plupart des graisses d'origines végétales. Certains animaux accumulent des oméga dans leurs tissus lorsque ces derniers sont fortement présents dans leur alimentation. Par exemple, les poissons accumulent une

forte quantité de EPA ou DHA, des oméga 3 présents dans les algues ou le krill qui constitue la base de la chaîne alimentaire sous-marine. Certains producteurs de volaille augmentent les taux d'oméga-3 dans la chair ou les œufs des poules en leur donnant un régime à base de graines de lin riche en acide α -linoléique, un oméga-3. L'acide α -linoléique est converti par l'organisme en EPA ou DHA, qui sont les formes majoritairement utilisées par l'organisme (figure 24). L'efficacité de cette conversion est cependant souvent remise en question et seule une fraction de l'acide α -linoléique consommé est transformé en EPA ou en DHA [462].

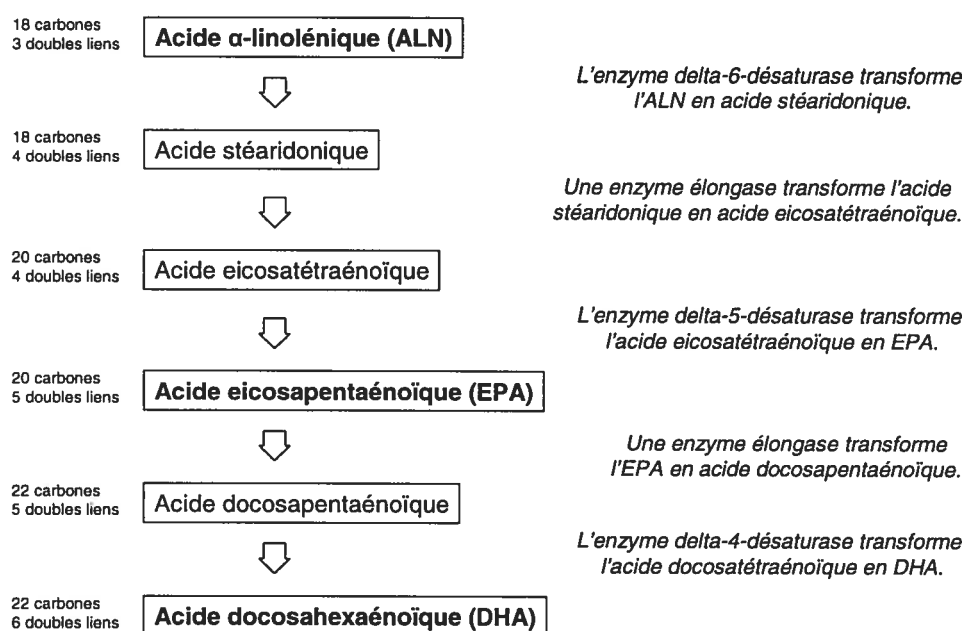


Figure 24 : Conversion de l'acide α -linoléique en EPA et en DHA

Suite aux études du groupe de Nielsen, d'autres chercheurs ont voulu tester les propriétés des acides gras oméga-3 sur des groupes de patients. Les résultats de ces études sont

assez partagés et ont créé une certaine controverse au sujet de l'utilisation des oméga-3 pour la prévention ou le traitement des maladies cardiovasculaires.

L'étude *GISSI-Prevenzione* a étudié des patients qui ont survécu à un infarctus du myocarde et ont été traités 3,5 ans avec des suppléments de vitamine E et d'oméga-3. Le traitement avec des oméga-3 a diminué significativement le risque de mortalité, d'infarctus et d'accident neuro-vasculaires de 14% alors que la vitamine E n'a eu aucun effet [463].

L'étude Zutphen a montré que les hommes âgés consommant peu ou pas de poisson présentaient un risque cardiovasculaire plus important. Cependant, la même étude a montré qu'une supplémentation en acide α -linolénique (un oméga-3) ne protégeait pas les patients de façon significative contre les maladies cardiovasculaires [464].

L'étude *Lyon Diet Heart trial* a comparé une diète Méditerranéenne riche en oméga-3 avec une diète dite 'prudente' conseillée par l'*American Heart Association* chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde [465]. La diète méditerranéenne a prévenu la mortalité cardiovasculaire (14 vs 44 pour la mortalité ou les infarctus et 27 vs 90 pour l'avènement des embolies, des accidents cérébro-vasculaires, de l'angine instable et de l'insuffisance cardiaque) bien que la pression artérielle ou le profil lipidique des patients n'ait pas été amélioré.

L'étude DART (*Diet and re-infarction*) a aussi montré une amélioration dans le taux de mortalité associé à des infarctus du myocarde chez des patients ayant déjà subi un infarctus. Cette amélioration était indépendante de la dyslipidémie observée chez ces patients et il a été suggéré que les oméga-3 auraient un effet anti-arythmique plutôt qu'anti-athérogénique [466].

Les femmes dans le *Nurses Health Study* qui consommaient davantage de poisson et d'oméga-3 présentaient moins de maladies coronariennes répertoriées sur un suivi de 16 ans par questionnaires [467].

La *US Physician Health Study* a montrée que le taux basal d'oméga-3 dans le sang était inversement relié au risque de mort subite, proposant ainsi une méthode économique pour prévenir la mortalité chez les patients à risques [468].

D'autre part, il a été montré qu'un traitement avec des suppléments d'oméga-3 (Omacor) chez des patient ayant subi un infarctus du myocarde n'a pas modifié les paramètres inflammatoires (interleukines), la fonction endothéliale et les facteurs de coagulation, alors que le taux de LDL était diminué chez les patients traités aux oméga-3 [469]. Aussi, il a été observé que le diabète pouvait affecter négativement le taux d'oméga-3 présent au niveau du myocarde [470]. Finalement, il a été rapporté que les oméga-3 à hautes doses semblent avoir un léger effet hypotenseur chez les hypertendus [471, 472].

5.1 Les bénéfices cardiovasculaires associés aux oméga-3

5.1.1 Les effets anti-arythmiques

Les oméga sont associés avec des effets anti-arythmiques. Ces effets ont été surtout étudiés par McLennan à partir des années 80. Une diète d'huile de tournesol riche en acide linoléique, un oméga-6, a réduit la durée des arythmies et la taille des infarctus dans des cœurs isolés de rats Wistar comparativement à une diète de graisses animale [473]. Les effets antiarythmiques des oméga-3 ont été observés chez le chien [474] et des effets préventif sur la tachycardie ont été observés chez l'humain [475, 476].

Des arythmies induites par l'isoprénaline chez le rat étaient moins prononcées pour des animaux nourris avec une diète riche en oméga-3 ou en oméga-6 comparativement aux rats avec une diète normale ou riche en graisses animales. De plus, l'indométhacine, un inhibiteur des cyclooxygénases 1 et 2, a contribué à atténuer les arythmies dans les groupes recevant les diètes normales ou riches en graisses animales mais n'a eu aucun effet sur les groupes recevant les oméga. Le mécanisme d'action antiarythmique des oméga serait donc relié à l'activité des cyclooxygénases et à la synthèse de certaines prostanoïdes [477]. D'ailleurs, une expérience sur des cardiomyocytes néonataux en culture a montré des propriétés arythmogéniques des prostacyclines PGD₂, PGE₂ et PGF₂ et du thromboxane A₂ alors; propriétés qui sont beaucoup plus faibles pour les analogues issus du métabolisme de l'EPA (PGD₃, PGE₃, PGF₃ et TXA₃) [478].

Une différence entre les propriétés anti-arythmiques des oméga-3 et les oméga-6 a été observée lors de la reperfusion des cœurs de rats où seuls les oméga-3 ont présenté un effet anti-arythmique. Les oméga-3 sont aussi les plus efficaces pour prévenir la vulnérabilité aux arythmies induites par une diète riche en graisses animales [479]. Les oméga-3 n'ont pas tous la même puissance. Par exemple, il semble que le DHA soit plus efficace que l'EPA pour prévenir l'arythmie cardiaque chez le rat [480]. Par contre, il a été montré chez le rat que l'EPA pouvait réduire les triglycérides dans le foie en augmentant l'activité de l'acyl-CoA oxydase alors que le DHA n'avait pas d'effets décelables sur le taux de triglycérides dans ce tissu [481]. Les effets des oméga-3 sur le contrôle du rythme cardiaque seraient causés par une hyperpolarisation des membranes des cardiomyocytes qui mettrait en cause un effet sur les courants calciques et sodiques dans les cardiomyocytes [482].

5.1.2 Les oméga-3 et l'athérosclérose

Les oméga-3 diminuent l'agrégation plaquettaire possiblement à cause de leurs effets sur la synthèses de certaines prostanoïdes, bien que cet effet ne semble pas avoir d'impact sur l'homéostasie sanguine [483, 484]. Un effet anti-athérogène des oméga-3 a été rapporté chez des patients qui recevaient déjà un traitement à l'aspirine. Une diminution des occlusions des vaisseaux greffés suite à des pontages a été observée chez les patients recevant un supplément d'huile de poisson [485]. Ces effets ont été expliqués par une modification de l'activité des cyclooxygénases et des lipoxygénases et de la production d'eicosanoïdes différents lorsque les oméga-3 sont utilisés comme substrat [255-258].

Une diète riche en oméga-3 réduit aussi la synthèse d'interleukines par les cellules immunitaires [486-488] et la production des certains facteurs de croissances impliqués dans le développement de l'athérosclérose [489]. Une diminution de l'expression des facteurs d'adhésion cellulaire (I-CAM, V-CAM) a aussi été observée ainsi qu'une diminution de certains marqueurs inflammatoires tels que NF- κ B [490, 491].

Les oméga-3 réduisent aussi le niveau des triglycérides sanguins [492]. L'huile de poisson (DHA et EPA) est d'ailleurs la plus efficace pour réduire les triglycérides [493]. Cet effet est bien établi et un apport de 4 g/jour d'oméga-3 réduit le niveau de triglycérides de 25-30% [494]. Des suppléments d'oméga-3 pour diminuer le taux de triglycérides sont souvent utilisés en combinaison avec des statines. Finalement, un autre mécanisme de protection a été proposé par lequel les oméga-3 dans la diète ont tendance à s'accumuler dans les plaques athérosclérotiques et à augmenter la stabilité de ces plaques [495].

5.2 Les effets des oméga-6

Bien que les acides gras insaturés favorisent une bonne santé cardiovasculaire, il existe tout de même certains impacts négatifs de ces acides sur d'autres systèmes biologiques, particulièrement pour les acides gras de type oméga-6. Il existe une certaine confusion en général dans le choix d'acides gras pertinents à donner en suppléments. Si la consommation d'oméga-3 dans la plupart des pays occidentaux est plutôt faible, la

consommation d'oméga-6 est par contre relativement élevée. La forte concentration d'oméga-6 dans les huiles végétales couramment utilisées en cuisine est probablement responsable de ce phénomène (table 2). Les habitudes alimentaires des Canadiens montrent qu'une forte proportion de l'apport calorique (35%) provient de lipides et que ces derniers négligent les fruits et légumes frais [496]. Les lipides proviennent surtout de viandes (à l'exception du poisson) et d'aliments de chaînes de restauration rapide qui ont tendance à surutiliser des huiles riches en graisses saturées et en oméga-6. L'instabilité chimique des oméga-3 les prédisposent à la dégradation et à l'oxydation sous l'effet de la chaleur et rend en général ces huiles peu pratiques pour la cuisson à cause des odeurs désagréables qu'elles dégagent (rancissement) ce qui explique la prédilection des restaurants à utiliser plutôt des acides gras oméga-6. Il n'existe pas d'étude à large échelle ou de preuve définitive qui montre un effet nocif des oméga-6 sur la santé cardiovasculaire, mais il existe cependant plusieurs résultats expérimentaux permettant de postuler une telle hypothèse.

Type de gras	AGS (g)	AGM (g)	AGP (g)	Ω -6 (g)	Ω -3 (g)	Ω -6/ Ω -3
Beurre	53	20	2	1.0	0.4	2,5:1
Huile de cameline	10	31	58	15	39	0,4:1
Huile de canola	7	59	30	20	9	2:1
Beurre de cacao	60	33	3	2.8	0.1	28:1
Huile de coco	87	6	2	2	*	-
Huile de maïs	13	27	54	53	1	53:1
Huile de coton	26	18	52	51.5	0.2	258:1
Huile de lin	9	20	66	13	53	0,2:1
Huile de pépins de raisins	10	16	70	69.6	0.1	696:1
Lard	39	45	11	10	1	10:1
Huile d'olive	14	68	11	10.4	0.5	21:1
Huile de palme	53	37	9	9.1	0.2	46:1
Huile d'arachide	17	46	32	32	*	-
Huile de soya	14	23	58	51	7	7:1
Huile de sésame	14	40	42	41.3	0.3	138:1
Huile de tournesol	11	22	63	62.3	0.4	156:1
Huile de navet	6	60	33	22	11	2:1
Huile de noix	9	23	63	53	10	5:1

Les compositions peuvent varier selon les sources.

Abbreviations et symbols utilisés:

AGS – Acide gras saturé

AGM – Acide gras monoinsaturé

AGP – Acide gras polyinsaturé

Ω -6 – Acide linoléique (omega-6)

Ω -3 – Acide alpha-linoléique (omega-3)

Ω -6/ Ω -3 - Ratio des omega-6 sur les omega-3

* - Données manquantes

Table 2 : Composition en acides gras d'huiles domestiques couramment utilisées.

Données tirées de <http://www.dlc.fi/~marianna/gourmet/fatacid.htm> et basées sur les résultats fournies par la *USDA National Nutrient Database* [497].

Les oméga-6 sont métabolisés en différents produits par rapport aux oméga-3 [498] (figure 25). La plupart des oméga-6 peuvent être convertis en acide arachidonique. Il a été démontré que l'acide arachidonique dérivé de l'acide linoléique constituait une source plus importante que l'acide arachidonique originant de l'alimentation [246]. Les oméga-6 favorisent aussi davantage la synthèse de produits pro inflammatoires [499] alors que les oméga-3 favorisent la formation de produits moins actifs ou antagonistes des effets des oméga-6.

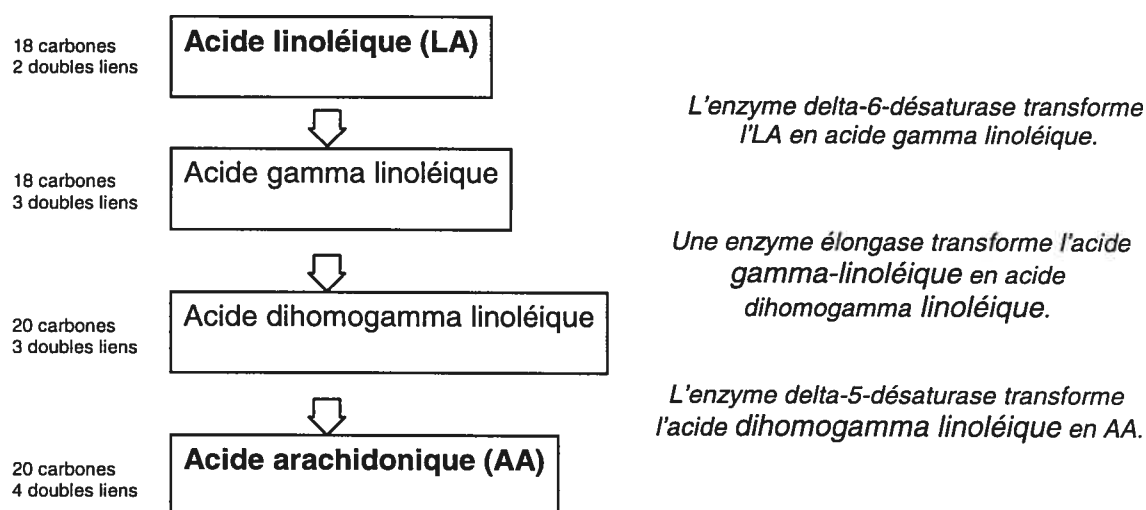


Figure 25 : La conversion des oméga-6 (acide linoléique) en acide arachidonique.

5.3 Le ratio oméga-6/oméga-3

Il a été proposé que l'utilisation des acides gras polyinsaturés par les voies du métabolisme de l'acide arachidonique soit un facteur déterminant dans la production de plusieurs facteurs inflammatoires et athérogènes. La quantité absolue d'oméga-3 ou d'oméga-6 serait secondaire et c'est surtout le rapport au ratio oméga-6/oméga-3 qui

serait déterminant dans la prépondérance de la voie utilisée. Ainsi, il a été suggéré que la haute proportion d'acide linoléique dans l'huile de canola atténuaient les effets protecteurs des oméga-3 contenus dans cette huile sur l'arythmie [500].

L'hypothèse qui se dégage de la plupart des études sur le sujet est que les oméga-3 agiraient comme des inhibiteurs compétitifs à l'acide arachidonique sur la synthèse de prostanoïdes et de leucotriènes et contribueraient ainsi à diminuer l'efficacité des voies de l'acide arachidonique [501]. Il a été prouvé que les oméga-3 diminuent l'agrégation plaquettaire en entravant l'activité des cyclooxygénases ou les lipoxygénases [502] par la diminution de la synthèse des prostaglandines de série 2 ou leucotriènes de série 4 ou par la synthèse des prostaglandines de série 3 ou leucotriènes de série 5 (figure 26) [503]. Ces produits alternatifs sont souvent inactifs ou ont des effets opposés aux produits des oméga-6. Lors de l'oxygénation des substrats de la cyclooxygénase, l'EPA adopte une conformation particulière 'étirée' qui ralentit la réaction [504]. À ce titre, l'EPA et le DHA sont des inhibiteurs compétitifs des cyclooxygénases [505].

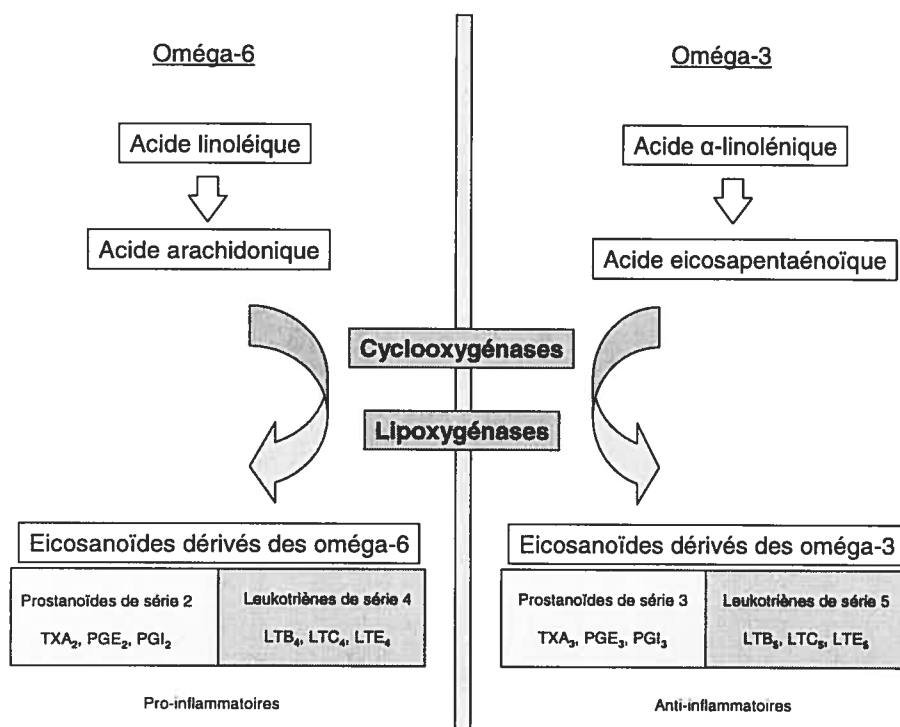


Figure 26 : Différences entre les produits des cyclooxygénases et des lipoxygénases selon le type d'acide gras utilisé.

Dans des cellules endothéliales humaines, les oméga-3 ne diminuent pas la synthèse de la prostacycline de type 2 (PGI₂) mais augmentent la synthèse de la prostacycline de type 3 (PGI₃) qui possède sensiblement les mêmes propriétés vasorelaxantes [506]. L'ingestion d'huile de foie de morue ou de maquereau a augmenté la synthèse de thromboxane-3 (TxA₃) et de PGI₃ chez l'homme [507]. Un autre système inhibiteur des prostanoïdes par les oméga-3 a été démontré dans les plaquettes puisque l'EPA et le DHA et non l'acide linoléique (un oméga-6) empêchaient la liaison du thromboxane A₂ ou de la prostaglandine H₂ sur leurs récepteurs sans affecter la coagulation par la thrombine [508] suggérant un autre site d'action des oméga-3. Ces résultats ont été confirmés par un autre groupe [509]. Finalement, les propriétés anti-athérogènes d'un régime à faible ratio n-

6/n-3 ont été démontrées dans un modèle de souris génétiquement déficientes en récepteurs à LDL lorsque comparé à un régime à ratio n-6/n-3 élevé après 16 semaines de traitement [510].

5.4 Le stress oxydant et les oméga-3 et 6

Puisque les oméga servent de substrats à des voies enzymatiques qui sont associées à la production de radicaux (lipoxygénase, cyclooxygénase, cytochrome p450 monooxygénase), le lien entre la consommation d'acides gras et la production de radicaux et leurs effets délétères a été proposé dans certaines études. L'hypothèse naturelle étant que les oméga-6 augmentent cette production et que les oméga-3 la diminuent.

La production d'anion superoxyde dans des neutrophiles polynucléaires a été atténuée par des traitements à l'EPA et au DHA et cet effet est dépendant de la synthèse des prostanoïdes par les cyclooxygénases [511]. Une autre étude a montré qu'un supplément d'huile de poisson pouvait diminuer la production de marqueurs de stress oxydant (TBARS) ainsi que de l'activité de la xanthine oxydase en augmentant l'activité de la SOD dans le corpus striatum de rats [512]. Des études in vitro ont montré que l'acide linoléique augmentait la production de radicaux en bonne part par une activation des lipoxygénases [513]. En effet, l'administration d'inhibiteurs des lipoxygénases a pu prévenir l'oxydation des LDL dans des cultures de cellules endothéliales et de macrophages [514, 515].

Il existe peu de données expérimentales accordant des propriétés antioxydantes aux oméga-3. Certaines études suggèrent même des propriétés pro-oxydantes de ces molécules. En fait, une étude dans laquelle des macrophages de cochon d'Inde ont été exposés à des acides gras insaturés (alpha-linolénique (n-3), linoléique (n-6), and oléique (n-9)) et un acide gras saturé (stéarique) a montré que les acides gras insaturés provoquaient une production d'anion superoxyde dose dépendante alors que l'acide stéarique n'a pas produit de réponse notable [516]. Les oméga-3 n'ont pas eu d'effets sur la peroxydation des lipides lorsque administrés à des rats à doses faibles (250mg/kg/jour). À doses plus élevées, les oméga-3 ont même augmenté la peroxydation des lipides et diminué la quantité de vitamine E [517]. Des volontaires humains sains ayant reçu des suppléments d'huile de poisson, ont démontré une susceptibilité accrue des LDL plasmatiques à l'oxydation [518]. Par contre, les oméga-3 protègent les lipides de la peroxydation lorsque administrés à des patients diabétiques non insulino-dépendants [519]. Une autre étude récente a montré la tendance des DHA à oxyder les lipides dans des cultures cellulaires [520]. La peroxydation des lipides a même été proposée pour expliquer l'effet cytotoxique des oméga-3 pour les cellules cancéreuses [521] ou pour expliquer l'induction de l'apoptose dans des cellules endothéliales humaines en prolifération [522] ou dans des cellules gliales en culture [523].

Ces observations indiquent donc que les oméga-3 ne seraient pas vraiment un agent thérapeutique, mais davantage un constituant essentiel d'une diète saine et équilibrée pour l'humain. Le problème majeur est dans la balance entre les oméga-6 et les oméga-3 et aussi le fait que une grande partie de la population humaine est en carence

nutritionnelle chronique d'oméga-3. Une question importante sur ce sujet serait si cette carence est un facteur significatif dans la détermination du risque cardiovasculaire chez l'humain.

CHAPITRE II

Sommaire des objectifs et méthodologies

Sommaire des objectifs

L'objectif de ce projet consistait à identifier les sources et les mécanismes de la production de l'anion superoxyde dans le réseau vasculaire dans le contexte du développement de l'hypertension chez le rat. Nos études étaient basées sur le modèle du rat hypertendu par une stimulation à l'angiotensine II. Ce modèle reproduit les effets d'une suractivation du système rénine-angiotensine II lié au développement de l'hypertension essentielle.

L'angiotensine II est associée à une production vasculaire accrue d'anion superoxyde par l'enzyme NAD(P)H oxydase. De plus, des études antérieures dans le laboratoire ont montré que les voies tyrosines kinases étaient impliquées dans cette production. Par contre, la nature exacte de ces voies tyrosines kinases était inconnue. Nous nous sommes donc intéressés à la voie ERK-MAPK, souvent activée dans des processus pathologiques mitogéniques et hypertrophiques liés à l'hypertension. Nous voulions savoir si cette voie était impliquée dans l'activation de la NAD(P)H oxydase par l'angiotensine II et si un inhibiteur de la voie ERK-MAPK ou un antioxydant pouvaient prévenir le développement de l'hypertension chez des rats traités à l'angiotensine II.

Nous avons effectivement démontré que la NAD(P)H oxydase et la voie ERK-MAPK étaient impliquées dans les effets prooxydants et presseurs de l'angiotensine II et suite à ces résultats, nous nous sommes intéressé à l'interrelation entre l'angiotensine II et l'endothéline-1 dans ce contexte. En effet, des études précédentes ont montré que

l'angiotensine II pouvait stimuler la synthèse de l'endothéline-1 dans les tissus vasculaires et que cette synthèse dépendait de l'activation de la voie ERK-MAPK. L'endothéline est aussi bien connue pour ses effets pro-oxydants. Nous avons donc proposé l'hypothèse que les effets oxydants de l'angiotensine II seraient causés par la synthèse d'endothéline-1. Nous voulions donc tester la capacité d'un antagoniste des récepteurs à l'endothéline à prévenir l'hypertension et la production d'anion superoxyde induites par un traitement à l'angiotensine II chez le rat. Nous voulions également caractériser cette interaction angiotensine-endothéline sur la réponse oxydante dans des cellules vasculaires de muscles lisses en culture.

Finalement, au cours de ces études, notre laboratoire a publié plusieurs travaux montrant que l'angiotensine II pouvait augmenter l'expression de la cyclooxygénase-2 dans l'aorte de rat et que la production d'anion superoxyde par l'angiotensine II pouvait être prévenue en majeure partie en bloquant cette surexpression. Les substrats des cyclooxygénases, les acides gras oméga-3 et oméga-6, sont connus pour leur capacité à modifier l'activité cyclooxygénase; les oméga-3 étant métabolisés beaucoup plus lentement que les oméga-6. L'omniprésence de ces acides gras dans l'alimentation et surtout la quantité élevée d'oméga-6 dans le régime alimentaire Nord-Américain nous ont amené à considérer l'hypothèse que ce type de régime pouvait amplifier la production d'anion superoxyde par les voies reliées à l'angiotensine II et ainsi constituer une source potentielle de radicaux dans les vaisseaux pouvant contribuer au développement de la maladie vasculaire et de l'hypertension. Nos résultats initiaux ont montrés que les oméga-6 contribuaient à la production de l'anion superoxyde dans les cellules vasculaires, mais

selon des voies enzymatiques indépendantes de la cyclooxygénase et de la NAD(P)H oxydase. Nous avons donc examiné l'implication des lipoxygénases et des cytochromes p450 monooxygénases qui sont aussi des enzymes utilisant les acides gras comme substrat.

Dans ce programme, nous avons donc utilisé plusieurs approches capables de générer de l'anion superoxyde *in vivo* et *in vitro* dans des cellules de muscles lisses en culture et dans l'aorte de rat ce qui nous a permis d'observer les effets du stress oxydant sur le développement de l'hypertension. Simultanément, plusieurs moyens de prévenir la génération d'anion superoxyde et l'augmentation de la pression artérielle dans ces modèles par des traitements avec des antioxydants, des inhibiteurs de voies de signalisation cellulaires et par des variations du régime alimentaire ont été étudiés. Ces explorations ont permis d'identifier et d'élaborer plusieurs stratégies antioxydantes pour le traitement et la prévention de l'hypertension.

Sommaire des méthodologies

Modèles et traitements pharmacologiques *in vivo*

Nous avons utilisé différents modèles développés chez le rat Sprague-Dawley ainsi que plusieurs traitements mis au point dans le laboratoire. Le premier modèle était le rat traité chroniquement à l'angiotensine II à l'aide d'une pompe osmotique diffusant de l'angiotensine II sous la peau de l'animal pendant 12 jours. Ces rats ont été traités avec un bloqueur des récepteurs AT1, le losartan, dans l'eau de breuvage, avec un inhibiteur des tyrosine kinases, la génistéine, par diffusion par pompes osmotiques, avec un inhibiteur de la voie ERK-MAPK, le PD98059, par injections intra péritonéales, avec un antioxydant, l'acide α -lipoïque et un antagoniste des récepteurs à l'endothéline, le LU302872, mélangés dans la nourriture.

Les autres modèles de rats recevaient quatre diètes contenant des proportions variables d'acides gras oméga-3 et oméga-6 pendant 6 semaines. Les quatre groupes étaient nourris avec un régime à base de maïs contenant une quantité négligeable d'oméga-3. Les groupes étaient ensuite gavés quotidiennement avec des mélanges d'huiles. Un groupe recevait un mélange d'huile de canola et de noix de coco, le deuxième groupe recevait un mélange d'acide arachidonique et d'huile de noix de coco, le troisième recevait un mélange d'acide docohexaénoïque et d'huile de canola et le quatrième recevait un mélange d'acide arachidonique et d'acide docohexaénoïque.

Paramètres hémodynamiques, études *in vivo*

La pression artérielle des animaux a été suivie tout au long des traitements par pléthysmographie sur la queue. La pression artérielle et le rythme cardiaque des animaux recevant des diètes variables en acides gras ont été mesurés à la fin du traitement directement par canulation fémorale. Les catécholamines circulantes ont été mesurées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Études *ex vivo*, paramètres biochimiques

La production d'anion superoxyde dans l'aorte des rats a été mesurée par une méthode utilisant la lucigénine (voir annexe 1). Des morceaux d'aortes ont été immergés dans une solution de lucigénine dans des tubes de verre et la luminescence émise a été mesurée par un compteur à luminescence.

L'activité de la voie ERK-MAPK et l'expression des protéines Nox1 et Nox4 dans l'aorte ont été mesurées par Western blot en homogénéisant les tissus dans un tampon de lyse avec détergent et en centrifugeant les débris cellulaires. Les préparations protéiques ont ensuite été chargées sur gel de polyacrylamide et transférées sur membranes de nitrocellulose. Des anticorps liant les protéines ERK phosphorylées et non-phosphorylées et les protéines Nox1 et Nox4 ont ensuite été utilisés. La détection des protéines a été effectuée à l'aide d'anticorps secondaires luminescents et d'un film.

Études *in vitro* dans les cultures cellulaires

Des cellules de muscles lisses vasculaires ont été isolées à partir d'aorte de rats Sprague-Dawley par digestion à la collagénase et à l'élastase et mises en culture dans un incubateur. Les cellules ont été traitées entre les passages 6 et 14 par de l'angiotensine II, de l'endothéline-1, des inhibiteurs de la voie ERK-MAPK (PD98059 et U0126), des inhibiteurs de la voie tyrosine kinase (génistéine et tyrphostine A25), des antagonistes de récepteurs à l'endothéline (LU302872, BQ-123 et BQ-3020), un inhibiteur de la synthèse de protéines (actinomycine D), un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase (apocynine), des acides gras oméga-3 (EPA, DHA) et des acides gras oméga-6 (acide arachidonique).

La production d'anion superoxyde a été mesurée dans les cellules par une méthode adaptée utilisant la lucigénine. Une autre méthode de détection de l'anion superoxyde avec la dihydroéthidine sur des cellules montées sur lamelles et observée par microscopie à fluorescence a aussi été utilisée.

La production d'endothéline-1 par les cellules de muscles lisses en culture a été évaluée par immunofluorescence sur plaques de 96 puits après différents temps de traitement avec l'angiotensine II. Enfin, l'expression des protéines Nox1 et Nox4 dans les cellules de muscles lisses a été déterminée par Western blot.

CHAPITRE III – ARTICLE SCIENTIFIQUE

NAD(P)H OXIDASE ACTIVATION BY ANGIOTENSIN II IS DEPENDENT ON
P42/44 ERK-MAPK PATHWAY ACTIVATION IN RAT'S VASCULAR SMOOTH
MUSCLE CELLS.

J Hypertens. 2003 May;21(5):927-36.

Marc-André Laplante, Rong Wu, Adil El Midaoui, Jacques de Champlain

NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells.

J Hypertens. 2003 May;21(5):927-36.

Contributions respectives au projet

Le projet a été supervisé par le Dr Jacques de Champlain qui a fourni le matériel, les locaux et l'encadrement nécessaire à la réalisation des expériences. Le projet et les objectifs initiaux ont été déterminés par Marc-André Laplante et Jacques de Champlain et les protocoles expérimentaux ont été conçus par Marc-André Laplante sous la supervision de Jacques de Champlain. La mise au point des protocoles et les expériences ont été effectuées par Marc-André Laplante avec l'assistance de Rong Wu, qui a mis au point le dosage de l'anion superoxyde, et d'Adil El Midaoui, qui a contribué aux expériences *in vivo*. L'article a été écrit par Marc-André Laplante avec l'assistance de Rong Wu pour la description des méthodes et d'Adil El Midaoui pour l'utilisation d'outils statistiques. L'article a été revu et corrigé par Jacques de Champlain.

**NAD(P)H OXIDASE ACTIVATION BY ANGIOTENSIN II IS DEPENDENT ON
P42/44 ERK-MAPK PATHWAY ACTIVATION IN RAT'S VASCULAR
SMOOTH MUSCLE CELLS**

Marc-Andre Laplante, Rong Wu, Adil El Midaoui and Jacques de Champlain

Research Group on Autonomic Nervous System, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Sponsorship: This research was supported by a grant from CIHR to J. de C. J. de C. is the holder of a career investigatorship from the J.C. Edward Foundation. M-A.L. is the holder of a studentship from the FCAR-FRSQ (Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche – Fonds de Recherche en Santé du Québec).

Correspondence and requests for reprints to Jacques de Champlain, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal, CP 6128, Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7.

Tel: +1 514 343 7562; fax: +1 514 343 2257;

e-mail: [REDACTED]

J Hypertens 21:927–936 & 2003 Lippincott Williams & Wilkins.

Journal of Hypertension 2003, 21:927–936

Keywords: angiotensin, antihypertensive agents, blood pressure, external regulated kinase (ERK), growth factors, NAD(P)H oxidase, smooth muscle, superoxide anion

Received 27 September 2002 Revised 11 December 2002

Accepted 15 January 2003

Abstract

Objective: To determine whether the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) oxidase and the increase of superoxide anion production by angiotensin II is dependent upon the activation of the ERK-MAPK pathway.

Methods : Hypertension was induced in Sprague–Dawley rats by infusing angiotensin II (200 ng/kg per min) through osmotic pumps for 12 days. The effects of treatments including an angiotensin II type 1 (AT1) blocker losartan (20 mg/kg per day), a tyrosine kinase inhibitor genistein (1.6 µg/kg per min), a specific ERK-MAPK inhibitor, PD98059 (2 mg/kg per day) and an antioxidant alpha-lipoic acid (500 mg/kg of chow) were evaluated during angiotensin infusion. The aortic superoxide anion production, the ERK-MAPK pathway activity and the systolic blood pressure (SBP), were measured following those treatments.

Results : Increases in the concentration of the superoxyde anion (1622 to 3719 cpm), in NAD(P)H activity (107%) and in the ERK-MAPK activity (3.6-fold) in the aorta as well as a rise in the arterial pressure (136 to 184 mmHg) were observed 12 days after initiating the treatments ($P < 0.05$). When the angiotensin-treated rats were treated either with losartan, genistein, PD98059 or alpha-lipoic acid, increases in superoxide anion production, in NAD(P)H oxidase activity, in ERK-MAPK activity and in blood pressure were attenuated. A correlation between the superoxide anion production and the ERK MAPK activity was also observed.

Conclusions : The present study suggests that the NAD(P)H-dependent increase of the superoxide anion production in the vascular tissue following a treatment with angiotensin II is dependent on the activation of the ERK-MAPK pathway.

Introduction

The relationship between oxidative stress and high blood pressure (BP) has been suggested in several experimental models of hypertension in the rat. Previous studies have shown that the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR) is associated with a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) oxidase mediated enhanced production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) in vascular tissues [1,2]. Other studies have demonstrated the important stimulatory effect of angiotensin II (ang II) on the vascular superoxide anion production through the activation of NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells [3–5]. Moreover, it was shown that ang II can upregulate the synthesis of NAD(P)H subunits [6].

It was demonstrated in our laboratory that induced superoxide anions production is dose dependently accompanied by an increase of the activity of tyrosine kinase dependent pathways and enhanced the inositol phosphate formation (IP_3) [7] suggesting the possibility of a modulation of tyrosine kinase pathway by superoxyde anion. Genistein and tyrphostin, two inhibitors of tyrosine kinase, were also shown to prevent the enhanced IP_3 production induced by superoxide anion [7,8] and to improve the relaxation of blood vessels treated with phenylephrine and nitro-glycerine [9].

The ERK-MAPK (external regulated kinase – mitogen activated protein kinase) pathway is a tyrosine kinasedependent pathway normally stimulated by growth factor receptors that are involved in cell growth, proliferation and differentiation. This pathway can also be activated by ang II through a c-src dependent mechanism [10] and was suggested to

play a role in vascular contraction [11] since the acute treatment with a specific ERK-MAPK inhibitor (the MEK inhibitor PD98059) following a treatment with ang II was shown to reduce blood pressure *in vivo* [12] as well as to prevent the contractile effects of ang II in isolated resistance arteries *in vitro* [13]. Moreover, it was suggested that ERK activation by ang II is dependent on reactive oxygen species (ROS) production [14,15] although another study did not support this hypothesis [16]. Therefore, the relationship between ang II-mediated generation of ROS and ERK activation remains unclear and the role of ERK-MAPK pathway on the activation of NAD(P)H oxidase and on the production of ROS has not yet been addressed.

Alpha-lipoic acid (6,8-thioctic acid), is a thiol antioxidant compound which was demonstrated to have antihypertensive properties in some experimental models such as deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension (DOCA-salt) [17], SHR [18], diabetic rats [19] and in insulin-resistant hypertensive rats [20]. Alpha-lipoic acid is a potent antioxidant as demonstrated by its ability to scavenge hydroxyl radicals, hypochlorous acid, peroxynitrite, and superoxide anions [21]. This drug was also found to increase the activity of the antioxidant reserve such as the thioredoxin [22], the glutathione peroxidase [23] and the superoxide dismutase [24] systems.

In the present study, the chronic treatment with ang II was used to induce hypertension as well as a NAD(P)H-dependent increase of the superoxide anion production in the aortic tissue of Sprague–Dawley rats. Moreover, the effects of a treatment for 2 weeks with an angiotensin II type 1 (AT1) receptor blocker, losartan, or a tyrosine kinase inhibitor,

genistein, a MEK inhibitor, PD98059, or an antioxidant, alpha-lipoic acid, were evaluated on the superoxide production, the NAD(P)H oxidase activity and on the ERK-MAPK pathway activity. The effects of MEK inhibitors on superoxide anion production were also tested in cultured smooth muscle cells following a treatment of ang II. This study was designed to determine whether the activation of NAD(P)H oxidase and the increase of superoxide anion production by ang II is dependent upon the ERK-MAPK pathway and whether the inhibition of superoxide production or ERK-MAPK pathway may prevent the development of hypertension in ang II-treated rats.

Material and methods

Animal preparation and treatments

Male Sprague–Dawley rats weighing around 250 g were used (Charles River Canada, St-Constant, Quebec, Canada). One group (n=15) was treated for 12 days with ang II (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) with Alzet 2002 osmotic pumps (200 ng/kg per min) (Alza Corporation, Palo Alto, California, USA) as described in a previous study [25]. Pumps were inserted subcutaneously after anaesthesia with sodium pentobarbital (52 mg/kg) given through intraperitoneal injections. Four other groups of angiotensin-infused rats were simultaneously treated with either an AT1 receptor blocker, losartan (n=6) or a tyrosine kinase inhibitor, genistein (n=8) or a specific MEK inhibitor, PD98059 (n=8) or an antioxidant, alpha-lipoic acid (Calbiochem, La Jolla, California, USA) (n=8). Losartan (20 mg/kg per day) (Merck Co Research Laboratories, Rahway,

New Jersey, USA) was administered with drinking water. Genistein (1.6 μ g/kg per min) (Sigma Chemical Co.) was infused through osmotic pumps. PD98059 (Tocris Cookson Ltd., Ellisville, Missouri, USA) was suspended in a 20% DMSO (0.9%NaCl) solution and administered by daily intraperitoneal injections (2 mg/kg per day). Alpha-lipoic acid was given with the rat's chow (500 mg/kg of chow, prepared by Ren's Feed and Supplies, LTD, Oakville, Ontario, Canada), 2 weeks before the ang II treatment and lasted until the rats were sacrificed. The doses of PD98059 and alpha-lipoic acid were determined according to previous publications [12,19]. Blood pressure was measured each other day with by tail cuff photoplethysmography using Rat Tail BP monitor model xbp2 (Harvard Apparatus Ltd., Edenbridge, England). After 12 days of single or combined treatment, rats were sacrificed after light anaesthesia with CO₂ and the aorta was sampled for superoxide anion radical and for ERK-MAPK activity measurements. All control groups received an insertion of osmotic pumps with vehicle solution (40% DMSO, 0.9% NaCl). One control group (n=15) received osmotic pumps alone and the other control groups received daily injections with a 20% DMSO (n=4) solution or a treatment with genistein (n=6), PD98059 (n=5) or lipoic acid (n=6). Finally, one group was left completely untreated (n=4). The investigation conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996).

Superoxide anion measurements

The superoxide anion production was measured using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method as described previously [26,27]. Small samples (2–3 mg wet weight) of aortic tissues were isolated and cleaned in oxygenated Krebs-Hepes buffer. When required, the endothelium was removed mechanically by gently rolling the aortic ring with a metal rod on a wet cheesecloth paper. After 10 min equilibration, samples were placed in scintillation vials containing a lucigenine (5 $\mu\text{mol/l}$) solution (Sigma Chemical Co.) and the emitted luminescence was measured with a Liquid Scintillation Counter (Wallac 1409; Perkin Elmer Life Science, St. Laurent, Quebec, Canada) as previously described [1]. The average luminescence value was estimated, the background value was subtracted and the result was divided by the weight of each sample. Moreover, the activation of NAD(P)H oxidase activity in the samples was assessed by adding NADH 10–4 mol/l (Sigma Chemical Co.) in the vials before counting. Basal superoxide induced luminescence was then subtracted from the luminescence value induced by NADH.

Cell lysis and western blotting

For the assessment of the ERK-MAPK pathway activity, aortas were first frozen and crushed in liquid nitrogen. Lysis and western blots were performed as described previously [11] with 80 μg of proteins loaded on gels. Membranes were exposed to X-Omat blue films (Kodak, Rochester, New York, USA) for 5 min. Gels were scanned and

densitometry of the bands was assessed using Scion image 4.0.2 (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA). Results for each condition were divided by control values to estimate the magnitude changes compared to controls. Reagents used in buffers were purchased from Sigma Chemical Co.

Cell culture

Single aortic SMCs from Sprague–Dawley rats were isolated and identified as described previously [28]. Cells between passages 6 and 14 were used. Cells were treated with ang II 10^{-6} mol/l for 10 min alone (n=10) or simultaneously with PD98059 10^{-5} mol/l (n=6), U0126 10^{-5} mmol/l (n=6) (Sigma Chemical Co.), genistein 10^{-5} mmol/l and tyrphostin A25 10^{-5} mmol/l (Sigma Chemical Co.). After the treatments, cells were washed in oxygenated Krebs-Hepes buffer and the superoxide anion production was measured with the lucigenin method described previously. Luminescence values were adjusted by the protein concentration (cpm/mg) of the samples.

Statistical analysis

Values are expressed as the mean \pm SD. The data were analysed using Student's t-test or analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni method with the program GraphPad Prism version 3.00 for Windows 95 or NT (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). Correlations were calculated by linear regression using

StatView for Windows, version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

For all treated, control and untreated groups, weight gain remained similar. The injection of 20% DMSO solution (vehicle for PD98059), and the administration of genistein, PD98059 or alpha-lipoic acid in control rats did not modify the blood pressure, basal superoxide production and ERK-MAPK activity significantly. Also, no significant differences were observed between all control groups and untreated intact rats (Table 1).

Effect of losartan, genistein, PD98059 and alpha-lipoic acid on superoxide anion production

Superoxide anion production in aorta from ang II-treated rats was increased by 129% compared to controls (1622.3 ± 127.0 to 3718.5 ± 445 cpm, $P < 0.05$). This production was lowered when we removed the endothelium in angiotensin II-treated rats (2516 ± 260 cpm, $P < 0.05$) (Table 1). When treated, the increase in superoxide anion induced by angiotensin was lowered by 87% with losartan (2115.1 ± 341 cpm), by 75% with genistein (2156.6 ± 247.2 cpm), by 68% with PD98059 (2306.0 ± 333.0 cpm) and by 67% with alpha-lipoic acid (2308.1 ± 208.9 cpm) ($P < 0.05$) (Fig. 1a).

The activation of NAD(P)H oxidase as assessed by the production of superoxide anion induced by NADH after subtracting the basal formation was found to be increased by 107% in ang II-treated rats (1036.5 ± 196.9 to 2374.7 ± 367.9 cpm, $P < 0.05$). The NAD(P)H oxidase activity induced by ang II was lowered by 143% with losartan (613.6 ± 209.8 cpm), by 113% with genistein (985.0 ± 215.9 cpm), by 82% with PD98059 (1369.1 ± 286.5 cpm) and by 104% with alpha-lipoic acid (979.6 ± 345.0 cpm) ($P < 0.05$) (Fig. 1b).

Effect of losartan, genistein, PD98059 and alpha-lipoic acid on ERK-MAPK activity.

The activity of ERK-MAPK pathway in the aorta was evaluated by the level of phosphorylated ERK following the various treatments. The treatment with ang II alone caused a marked increase in ERK phosphorylation by 3.6 ± 0.5 ($P < 0.05$)-fold compared with controls. The activation of the ERK-MAPK pathway was significantly impaired by treatments with losartan (1.9 ± 0.6 -fold increase, a reduction of 65% of the increase caused by ang II), genistein (1.4 ± 0.2 -fold, a reduction of 85%), PD98059 (1.6 ± 0.4 -fold, a reduction of 77%) and alpha-lipoic acid (1.5 ± 0.3 -fold, a reduction of 81%) ($P < 0.05$) (Fig. 2a). In every condition, no variations in unphosphorylated form of ERK were observed indicating that the increases in ERK activity were not caused by increases in total protein production (Fig. 2b). Superoxide anion production and ERK-MAPK activity values from all animals were significantly correlated to each others $r=0.70$, $P < 0.001$ (Fig. 3).

Effect of ERK-MAPK pathway inhibitors on superoxide anion production in cultured smooth muscle cells

Treatments with ang II 10^{-6} for 10 min increased superoxide anion production by 253% (7711 ± 1974 to 27250 ± 4415 cpm, $P < 0.05$). This increase was lowered to 49% (7711 ± 1974 to 11475 ± 3466 cpm, $P < 0.05$), 44% (7711 ± 1974 to 11095 ± 2111 cpm, $P < 0.05$), 55% (7711 ± 1974 to 11955 ± 2879 cpm, $P < 0.05$) or 76% (7711 ± 1974 to 13582 ± 3130 cpm, $P < 0.05$) with simultaneous treatment with PD98059, U0126, tyrphostin or genistein respectively (Fig. 4). Treatments with PD98059 or U0126 alone did not cause any significant variation of basal superoxide anion production compared with controls (data not shown).

Effect of losartan, genistein, PD98059 and alpha-lipoic acid on the blood pressure

Following a 12 days infusion of ang II, an increase of 35% in SBP was observed (135.9 ± 6.1 to 183.5 ± 4.2 mmHg, $P < 0.05$). After 12 days, the BP levels were lower ($P < 0.05$) when the ang II infusion was combined with losartan (144.9 ± 7.1 mmHg), genistein (151.3 ± 7.2 mmHg), PD98059 (141 ± 7.0 mmHg) and alpha-lipoic acid (152.9 ± 5.3 mmHg) treatments compared with ang II-treated rats and increases in blood pressure were markedly attenuated by 81, 68, 92 and 64%, respectively by the above treatments (Fig. 5).

Discussion

The present study demonstrates that the ang II-induced enhanced production of superoxide anion by activation of NAD(P)H oxidase is dependent on the activation of the tyrosine kinase-ERK-MAPK pathway in the aorta. The prevention of the increase in NAD(P)H activity induced by the chronic ang II infusion as well as the prevention on the increase of blood pressure by the treatments with inhibitors of the tyrosine kinase-ERK-MAPK pathway constitute novel observations into the mechanisms involved in the development of angiotensin-induced hypertension.

This study showed that a treatment with ang II increased both the superoxide anion production (Fig. 1a) and the NAD(P)H activity (Fig. 1b) confirming previously published observations [4]. These increases are partly attenuated by the removal of the endothelium (Table 1) suggesting that part of the superoxide production in the aorta is dependent on the endothelium. However, for the angiotensin-treated rats, most of the superoxide production depends on the smooth muscle cells (67%). The increase in superoxide production is likely to be directly related to an increased activity of NAD(P)H oxidase since DPI (diphenyleneiodonium), an inhibitor of NAD(P)H oxidase, was shown to prevent superoxide production induced by ang II [14]. Similar increases in NAD(P)H oxidase activity were also reported in other hypertension models [2] suggesting that the overactivation of this enzyme and its associated overproduction of superoxide anion may play an important role in the pathogenesis of hypertension.

Although an association between superoxide anion production and hypertension was postulated, no specific mechanism for the elevation of blood pressure by ROS was demonstrated in those experimental models. One hypothesis is that the denaturation of nitric oxide by O_2^- and the production of peroxynitrite by superoxide anion is known to impair and reduce the relaxing effects of nitric oxide in cultured vascular smooth muscle cells [29]. Treatments with vitamin C or E have been shown to reduce the blood pressure in hypertensive rats [30,31]. In other studies, treatments with tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidinoxyl) [32], superoxide dismutase [33], n-acetyl cysteine [34] or glutathione [35] were also reported to lower the blood pressure in SHR rats, in DOCA-salt hypertensive rats [36] and in ang II-treated rats [37].

In the present study, the chronic ang II treatment was clearly shown to activate the ERK-MAPK pathway in the aorta. The observation that ERK-MAPK inhibition with genistein or PD98059 reduced superoxide production and NAD(P)H oxidase activity (Fig. 1) supported the possibility that the regulation of NAD(P)H oxidase and its associated enhanced superoxide production may be mediated through the tyrosine kinase-ERK-MAPK pathway. However, the fact that alpha-lipoic acid also reduced the NAD(P)H oxidase activity indicated that the superoxide anion itself or other free radicals may stimulate the NAD(P)H oxidase activity.

The ERK-MAPK activation by ang II is a well-known phenomenon in cultured smooth muscle cells [16,38]. It was also postulated that this activation was related with the production of reactive oxygen species (ROS) [39] particularly the superoxide anion

produced by NAD(P)H oxidase [40,41]. Our observations demonstrated that this effect can also be observed in vivo in vascular tissues following a 2-week treatment of ang II (Fig. 2) and that it can be blocked by losartan, an AT1 blocker, thus demonstrating that the phosphorylation of ERK is dependent on the AT1 receptor activation as was observed for the NAD(P)H oxidase activation. The observation that the treatments with MEK inhibitors prevented the activation of ERK-MAPK pathway by ang II demonstrated that it is possible to modulate ERK activity in vivo in aortic tissues.

Previous studies suggested that redox-mediated activation of ERK1/2 can occur in smooth muscle cells [42–46] either by direct activation or through various tyrosine kinase-dependent pathways. ERK might also activate NAD(P)H directly since it was proven that p-42 ERK can directly phosphorylate p47 phox, an NAD(P)H oxidase subunit [47]. A relationship between ang II, ROS and the activity of the p42/44 ERK-MAPK pathway was also observed in previous in vitro studies [14,15,48]. A similar phenomenon was observed in vivo since the treatment with a free radical scavenger, alpha-lipoic acid, was found to reduce ERK-MAPK activity in vascular tissue. Moreover, the finding of a strong positive correlation between superoxide anion production and ERK-MAPK activity (Fig. 3) further supports the hypothesis of the involvement of ERK-MAPK pathway in the superoxide production induced by ang II. We could verify that the superoxide production by ang II and NAD(P)H oxidase activation was dependent on ERK 1/2 and tyrosine kinase activation in cultured smooth muscle cells since this production could be completely blocked by simultaneous treatments with PD98059, U0126, tyrphostin and genistein (Fig. 4). We propose that the superoxide anion can

increase ERK1/2 phosphorylation and ERK1/2 can increase superoxide production by activating NAD(P)H oxidase. Thus, both the ERK-MAPK pathway and the superoxide anion production can mutually stimulate each other.

It was previously suggested that the ERK-MAPK pathway might play a direct role in blood pressure regulation [11,12]. Also, the ERK-MAPK pathway stimulation by ang II in smooth muscle cells of resistance arteries from hypertensive patients was found to be significantly greater compared to normotensive patients [10]. Our results support this hypothesis since genistein, a tyrosine kinase inhibitor, and PD98059, a MEK inhibitor, both significantly reduced the rise in blood pressure and ERK phosphorylation in aortas of rats chronically infused with ang II similarly to the preventive effect of the treatment with losartan (Figs 2 and 5a–c). Genistein is a rather non-specific ERK inhibitor and can affect many tyrosine kinase dependent pathways that could play a role in superoxide production or cell proliferation [49] and it is possible that their inhibition could affect blood pressure independently of an action on the ERK-MAPK pathway. However, since a marked inhibition of the angiotensin-induced rise in blood pressure was observed with the specific MEK inhibitor PD98059, it may be concluded that the hypertensive action of ang II is mainly mediated through the ERK-MAPK pathway. An acute effect of PD98059, consisting of a short-lasting (2 h) lowering of blood pressure was also previously observed in another study on the angiotensin-induced hypertension using a single dose treatment [12]. Since cell proliferation or arterial remodelling constitute long-term events, such an acute effect of the inhibition of the ERK-MAPK pathway on blood pressure suggests a direct implication of that pathway in the mechanism of hypertension induced

by ang II rather than an indirect effect secondary to vascular remodelling mechanisms. Recent studies suggested that the ERK-MAPK pathway could control acutely vascular tone by regulating calcium channels [13]. Whether this hypertensive effect of the ERKMAPK pathway depends solely on an increase in ROS generation or is dependent upon other mechanisms still remains to be clarified. However, the prevention of hypertension that was observed with the treatment with alpha-lipoic acid in this model of hypertension (Fig. 5d), suggests that the hypertensive actions of the ERKMAPK pathway depends strongly on free radicals production.

In conclusion, the present observations indicate that treatments with a tyrosine kinase inhibitor, genistein, a MEK inhibitor, PD98059, and a superoxide anion scavenger, alpha-lipoic acid, can prevent the activation of NAD(P)H oxidase and the production of superoxyde anion induced by a chronic infusion of ang II in Sprague–Dawley rats. The reduction of superoxyde anion production associated to those treatments occurred concomitantly with a reduction in the increase of SBP as well as with a lowering of the ERK-MAPK activity. Ang II thus appears to increase the blood pressure through ERK-MAPK activation and enhanced superoxide production by activation of AT1 receptors since those changes could be prevented by the treatment with losartan, a specific AT1 inhibitor. Those observations suggest an interactive mechanistic relationship between superoxide production and ERKMAPK activation in the development of ang II-induced hypertension.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Diane Papin for her technical support and Carole Champagne for her secretarial assistance.

References

1. Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxyde production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 35:1055–1061.
2. Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; 19:741–748.
3. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74:1141–1148.
4. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916–1923.
5. Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of

- phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 2001; 19:1245–1254.
6. Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, et al. Expression of a functionally active gp91 phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2002; 90:1205–1213.
 7. Wu L, de Champlain J. Effects of superoxide on signaling pathways in smooth muscle cells from rats. *Hypertension* 1999; 34:1247–1253.
 8. Wu L, de Champlain J. Superoxide anion-induced formation of inositol phosphates involves tyrosine kinase activation in smooth muscle cells from rat mesenteric artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259:239–243.
 9. Satake N, Imanishi M, Shibata S. Increased nitroglycerin-induced relaxation by genistein in rat aortic rings. *Eur J Pharm* 1999; 377:193–197.
 10. Touyz RM, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME, Schiffrin EL. Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension* 2001; 38:56–64.
 11. Matrougui K, Eskildsen-Helmond YE, Fiebeler A, Henrion D, Levy BI, Tedgui A, et al. Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 2000; 36:617–621.
 12. Muthalif MM, Karzoun NA, Gaber L, Khandekar A, Benter IF, Saeed AE, et al. Angiotensin II-induced hypertension: contribution of Ras GTPase/Mitogen-

- activated protein kinase and cytochrome P450 metabolites. *Hypertension* 2000; 36:604–609.
13. Garcha RS, Sever PS, Hughes AD. Mechanism of action of angiotensin II in human isolated subcutaneous resistance arteries. *Br J Pharm* 2001; 134:188–196.
 14. Sano M, Fukuda K, Sato T, Kawaguchi H, Suematsu M, Matsuda S, et al. ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res* 2001; 89:661–669.
 15. Frank GD, Eguchi S, Yamakawa T, Tanaka S, Inagami T, Motley ED. Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology* 2000; 141:3120–3126.
 16. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Tamaki T. Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertens Res* 2001; 24:251–261.
 17. Takaoka M, Kobayashi Y, Yuba M, Ohkita M, Matsumura Y. Effects of alpha-lipoic acid on deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Eur J Pharm* 2001; 424:121–129.
 18. Vasdev S, Ford CA, Parai S, Longerich L. Gadag versus Dietary alphalipoic acid supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2000; 18:567–573.
 19. Kocak G, Aktan F, Canbolat O, Ozogul C, Elberg S, Yildizoglu-Ari N, et al. Alpha lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure,

- vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. *Diabetes Nutr Metab* 2000; 13: 308–318.
20. El Midaoui A, de Champlain J. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 2002; 39:303–307.
 21. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 2001; 17:888–895.
 22. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1287–1312.
 23. Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharm Toxicol* 2000; 86:234–241.
 24. Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Eur J Pharm* 2000; 398:139–146.
 25. Herizi A, Jover B, Bouriquet N, Mimran A. Prevention of the cardiovascular and renal effects of angiotensin II by endothelin blockade. *Hypertension* 1998; 31:10–14.
 26. Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 1995; 95:187–194.
 27. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546–2551.

28. Wu L, de Champlain J. Inhibition by cyclic AMP of basal and induced inositol phosphate production in cultured aortic smooth muscle cells from Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1996; 14:593–599.
29. Somers MJ, Harrison DG. Reactive oxygen species and the control of vasomotor tone. *Curr Hypertens Rep* 1999; 1:102–108.
30. Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, Rad B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 2000; 36:142–146.
31. Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M, Huang A, Frei B, Keaney JF Jr, et al. Treatment of hypertension with ascorbic acid. *Lancet* 1999; 354: 2048–2049.
32. Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membranepermeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 1998; 32:59–64.
33. Alexander MY, Brosnan MJ, Hamilton CA, Fennell JP, Beattie EC, Jardine E, et al. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase but not Cu/Zn superoxide dismutase restores nitric oxide availability in the SHRSP. *Cardiovasc Res* 2000; 47:609–617.
34. Cabassi A, Bouchard JF, Dumont EC, Girouard H, Le Jossec M, Lamontagne D, et al. Effect of antioxidant treatments on nitrate tolerance development in normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 2000; 18:187–196.
35. Akpaffiong MJ, Taylor AA. Antihypertensive and vasodilator actions of antioxidants in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1998; 11:1450–1460.

36. Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC, et al. Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension* 2001; 37:781–786.
37. Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S, et al. Systemic and regional hemodynamic responses to tempol in angiotensin II-infused hypertensive rats. *Hypertension* 2001; 37:77–83.
38. Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T. Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem* 2001; 276: 7957–7962.
39. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22 phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:940–948.
40. Mukhin YV, Garnovskaya MN, Collinsworth G, Grewal JS, Prendergrass D, Nagai T, et al. 5-Hydroxytryptamine_{1A} receptor/Gi₁beta₂gamma stimulates mitogen-activated protein kinase via NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species upstream of src in chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochem J* 2000; 347(Part 1):61–67.
41. Tanaka K, Honda M, Takabatake T. Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:676–685.

42. Locher R, Brandes RP, Vetter W, Barton M. Native LDL induces proliferation of human vascular smooth muscle cells via redox-mediated activation of ERK 1/2 mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 2002; 39:645–650.
43. Lee SL, Wang WW, Finlay GA, Fanburg BL. Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol* 1999; 277:L282–L291.
44. Lee SL, Simon AR, Wang WW, Fanburg BL. H₂O₂ signals 5-HT-induced ERK MAP kinase activation and mitogenesis of smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:L646–L652.
45. Huang WC, Chio CC, Chi KH, Wu HM, Lin WW. Superoxide anion-dependent Raf/MEK/ERK activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2), ciglitazone, and GW1929. *Exp Cell Res* 2002; 277:192–200.
46. Bhunia AK, Han H, Snowden A, Chatterjee S. Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; 272:15642–15649.
47. El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47 phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996; 271:6374–6378.
48. Xie Z, Pimental DR, Lohan S, Vasertriger A, Pligavko C, Colucci WS, et al. Regulation of angiotensin II-stimulated osteopontin expression in cardiac

microvascular endothelial cells: role of p42/44 mitogen-activated protein kinase and reactive oxygen species. *J Cell Physiol* 2001; 188:132–138.

49. Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B, Ling BN, Bernstein KE. Angiotensin II signalling events mediated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal* 1996; 8:21–26.

Table 1 Blood pressure, superoxide production, NAD(P)H activity, ERK-MAPK activity and body weight data of all groups

Groups	BP (mmHg)	O ₂ ⁻ (cpm)	NAD(P)H (cpm)	ERK (control = 1)	Body weight (g)
Control (n = 15)	135.9 ± 6.1	1622 ± 127	1037 ± 197	1.0 ± 0.1	319.4 ± 4.7
Control E- (n = 4)		924 ± 500	672 ± 560		
Untreated (n = 4)	139.0 ± 11.1	1766 ± 437	1345 ± 590	0.8 ± 0.5	316.4 ± 1.2
DMSO (n = 4)	138.6 ± 2.7	1869 ± 260	999 ± 300	1.4 ± 0.3	315.8 ± 8.9
Gen (n = 6)	145.3 ± 5.3	2091 ± 630	800 ± 454	1.1 ± 0.3	325.1 ± 7.9
PD (n = 5)	123.0 ± 3.0	1655 ± 184	694 ± 277	0.6 ± 0.4	312.2 ± 5.2
LA (n = 6)	137.4 ± 6.1	1545 ± 233	400 ± 345	1.3 ± 0.2	330.4 ± 11.0
Ang II (n = 15)	183.5 ± 4.2	3718 ± 445	2375 ± 368	3.6 ± 0.5	310.1 ± 2.5
Ang II E- (n = 4)		2516 ± 260	1700 ± 541		
Ang II los (n = 6)	144.9 ± 7.1	2115 ± 341	614 ± 210	1.9 ± 0.6	321.5 ± 7.1
Ang II gen (n = 8)	151.3 ± 7.2	2157 ± 247	985 ± 216	1.4 ± 0.2	320.0 ± 3.5
Ang II PD (n = 8)	141.0 ± 7.0	2306 ± 333	1369 ± 287	1.6 ± 0.4	311.1 ± 6.3
Ang II LA (n = 8)	152.9 ± 5.3	2308 ± 209	980 ± 345	1.5 ± 0.3	327.8 ± 2.1

Table 1) Blood pressure, superoxide production, NAD(P)H activity, ERK-MAPK activity and body weight data of all groups

BP, blood pressure; O₂⁻, superoxide anion production; NAD(P)H, NAD(P)H oxidase activity; ERK, ERK-MAPK activity; Control, rats with osmotic pumps containing vehicle solution; Untreated, no treatment or surgery of any kind; DMSO, 20% DMSO injections; Gen, treatments with genistein alone; PD, treatments with PD98059 alone; LA, treatments with lipoic acid alone; Ang II, treatments with angiotensin II; Ang II los, gen, PD, LA, treatments with angiotensin II in combination with losartan, genistein, PD98059 or lipoic acid; E-, removal of the endothelium for aortic superoxide measurements. Data are presented as mean ± SEM (n=4–15). *Significantly different from control (P < 0.05).

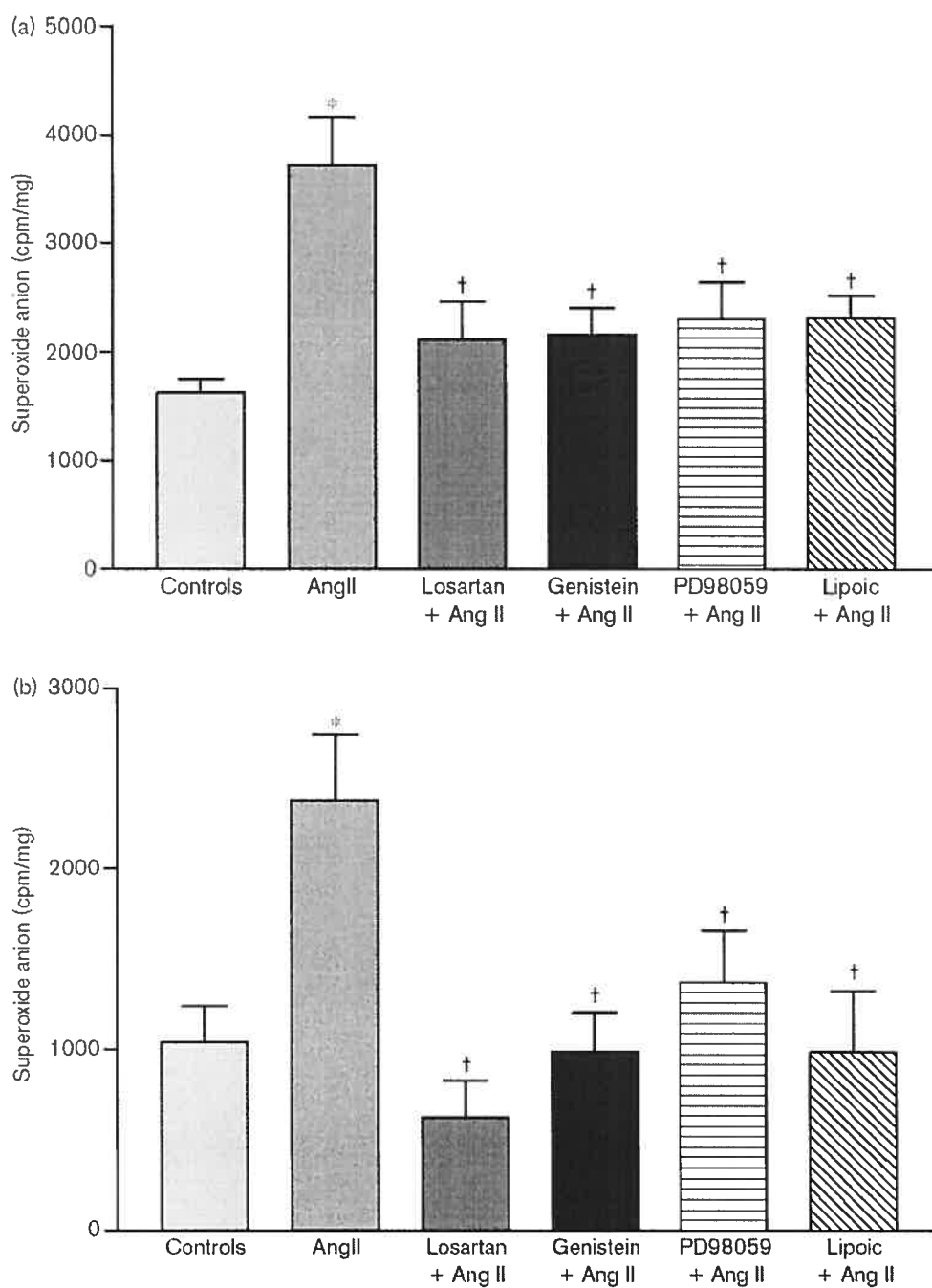
Figures**1)**

Figure 1) (a) Effect of losartan, genistein, PD98059, and alpha-lipoic acid, on the basal superoxide anion production in the aorta of angiotensin II-treated hypertensive rats.

The increase of superoxide anion production induced by angiotensin II was significantly blunted by losartan, genistein, PD98059 and alpha-lipoic acid. Data are presented as mean \pm SEM (n=6 to 15). *Significantly different from control ($P < 0.05$). †Significantly different from group treated with Ang II alone ($P < 0.05$).

(b) Effects of various therapies on NADH oxidase activity in aorta.

The NADH oxidase activity was estimated by the superoxide anion formation stimulated by NADH 10^{-4} mol/l after subtraction of basal superoxide production. The increase in NAD(P)H oxidase activity induced by Ang II was markedly blunted by treatments with losartan, genistein, PD98059 and alpha-lipoic acid. *Significantly different from control ($P < 0.05$). †Significantly different from group treated with Ang II alone ($P < 0.05$).

2)

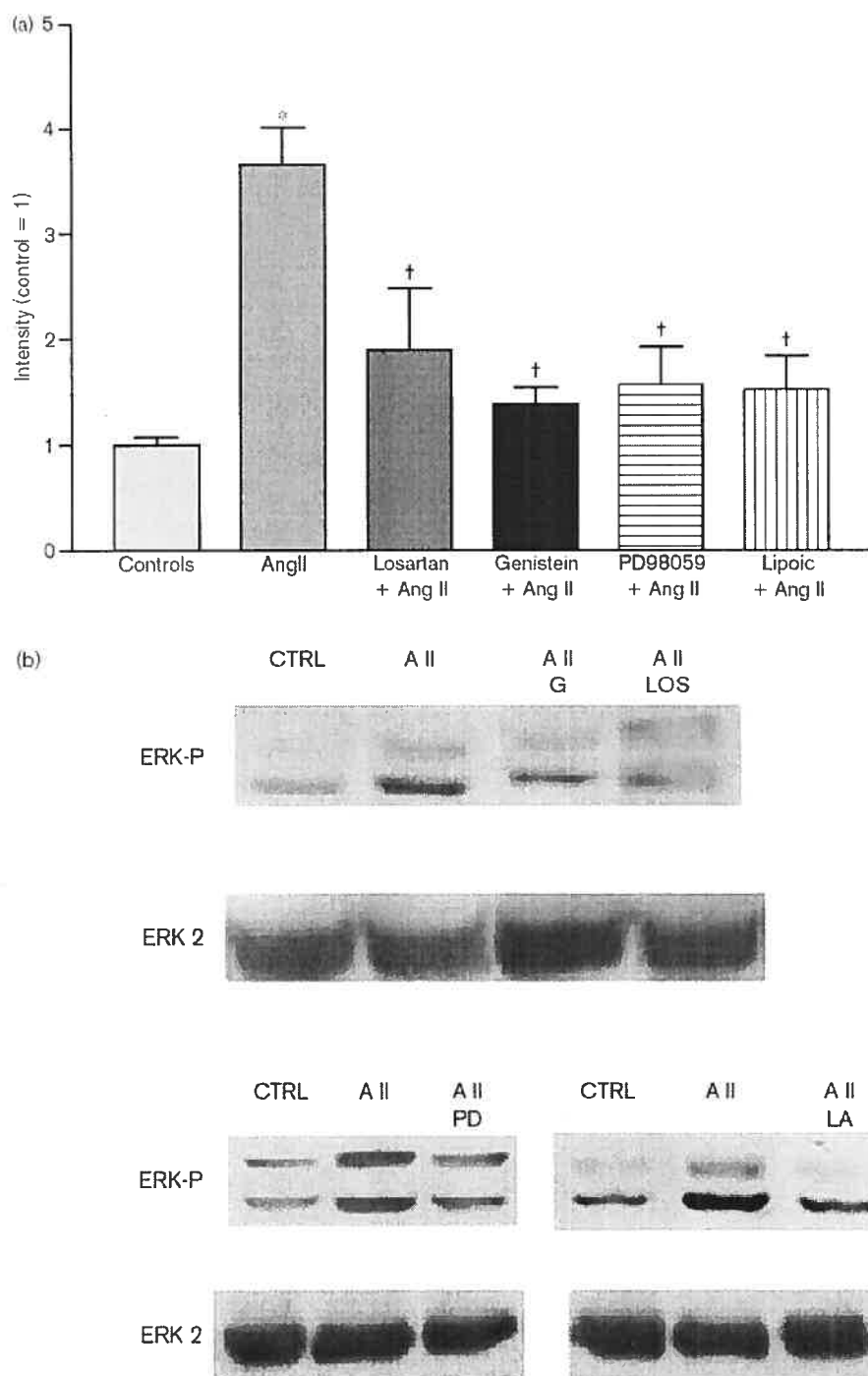


Figure 2) (a) ERK-MAPK activity measured by western blot in aortas of normotensive rats and rats treated with angiotensin II alone or combined with losartan, genistein, PD98059 or alpha-lipoic acid.

The intensities of the bands corresponding to phosphorylated ERK were measured and compared on a scale where control values was equal to one. All the treatments significantly reduced or blocked the activation of phosphorylated ERK by angiotensin II.

(b) Representative sample of the western blots obtained showing that the amount of unphosphorylated ERK was not affected by any of the treatments.

CTRL, controls; A II, Angiotensin II; G, genistein; LOS, losartan; PD, PD98059; LA, alpha-lipoic acid; ERK-P, phosphorylated ERK (active form); ERK2, unphosphorylated ERK (inactive form). Data are presented as mean \pm SEM (n=6 to 15) *Significantly different from control ($P < 0.05$). †Significantly different from the group treated with Ang II alone ($P < 0.05$).

3)

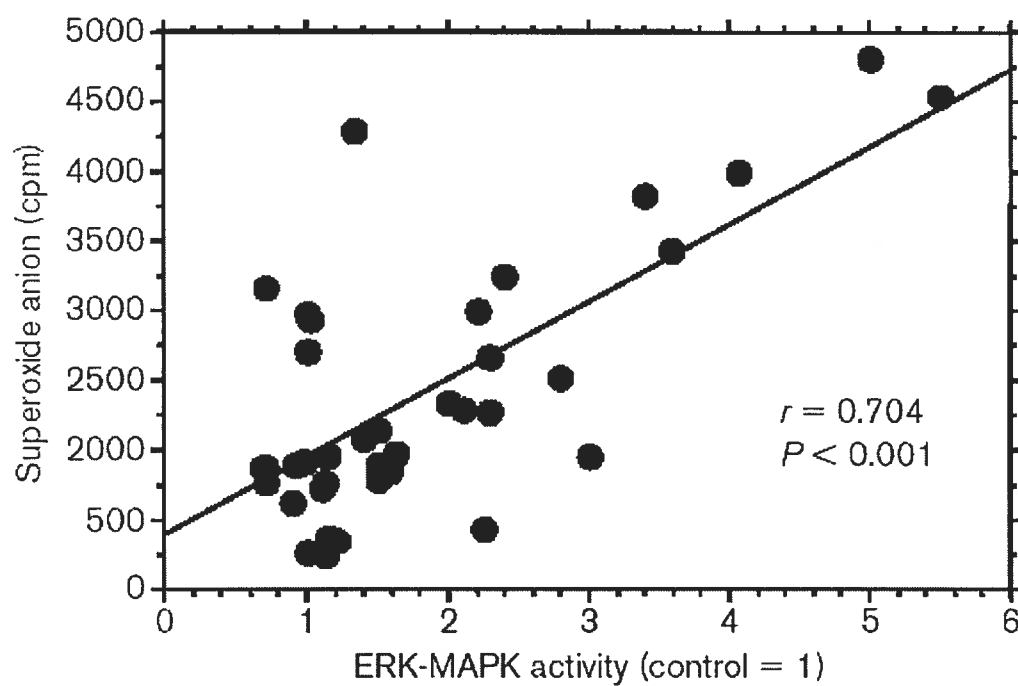


Figure 3) Correlation between superoxide production and ERK-MAPK activity by linear regression analysis.

$r=0.704$, $P < 0.001$ for all groups of animals.

4)

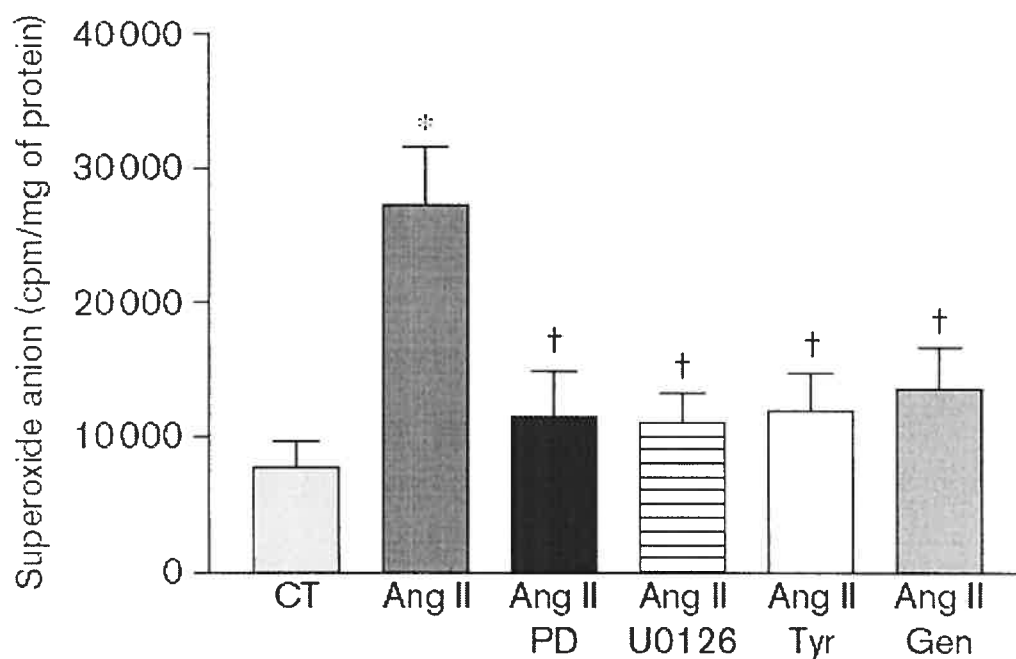


Figure 4) Effects of treatments with angiotensin II alone and combined with the MEK inhibitors PD98059 and U0126 on superoxide anion production in cultured vascular smooth muscle cells.

Cells were treated with angiotensin II 10^{-6} mol/l combined with PD98059 10^{-5} mol/l, U0126 10^{-5} mol/l, tyrphostin A25 10^{-5} mol/l or genistein 10^{-5} mol/l for 10 min. Data are presented as mean \pm SEM (n=4 to 10). CT, controls; Ang II, Angiotensin II; PD, PD98059; Tyr, Tyrphostin A25; Gen, Genistein. *Significantly different from control ($P < 0.05$). †Significantly different from group treated with Ang II alone ($P < 0.05$).

5)

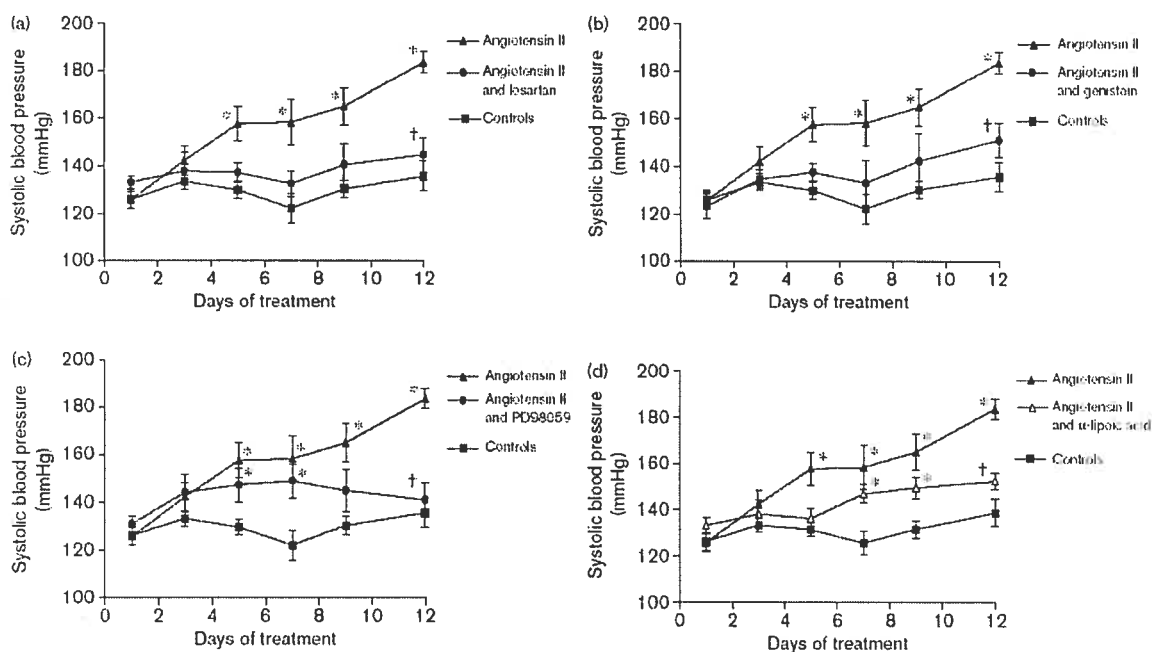


Figure 5) Effect of (a) an AT1 blocker losartan, (b) a tyrosine kinase inhibitor, genistein (c) a MEK inhibitor, PD98059 and (d) an antioxidant, alpha-lipoic acid, on the development of angiotensin II-induced hypertension in rats.

Rats were observed for a period of 12 days and the blood pressure was measured every other day with a tail cuff method. The blood pressure was increased in angiotensin II-treated rats and this increase was significantly blunted with a combined treatment with an AT1 inhibitor, an ERK-MAPK inhibitor and a superoxide anion scavenger. Data are presented as mean \pm SEM (n=6 to 15). *Significantly different from control ($P < 0.05$). †Significantly different from group treated with Ang II alone ($P < 0.05$).

CHAPITRE IV – ARTICLE SCIENTIFIQUE

**ENDOTHELIN MEDIATES SUPEROXIDE PRODUCTION IN ANGIOTENSIN II-
INDUCED HYPERTENSION IN RATS.**

Free Radic Biol Med. 2005 Mar 1;38(5):589-96

Laplane MA, Wu R, Moreau P, de Champlain J.

Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats.

Free Radic Biol Med. 2005 Mar 1;38(5):589-96.

Contributions respectives au projet

Le projet a été supervisé par le Dr Jacques de Champlain qui a fourni le matériel, les locaux et l'encadrement nécessaire à la réalisation des expériences. Le Dr Pierre Moreau a fourni l'endothéline et a aussi suggéré l'idée initiale qui a démarré le projet. Le projet et les expériences nécessaires ont ensuite été élaborés par Marc-André Laplane sous la supervision de Jacques de Champlain. La mise au point des protocoles et les expériences ont été effectuées par Marc-André Laplane avec l'assistance de Rong Wu qui a mis au point le dosage de l'anion superoxyde. L'article a été écrit par Marc-André Laplane avec la révision de Rong Wu. L'article a été revu et corrigé par Jacques de Champlain.

ENDOTHELIN MEDIATES SUPEROXIDE PRODUCTION IN ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION IN RATS

Marc-André Laplante*, Rong Wu*, Pierre Moreau†, Jacques de Champlain*

Research Group on Autonomic Nervous System

*Department of Physiology,

†Faculty of Pharmacy,

Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

This research was supported by a grant from Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to J. de Champlain. M-A. Laplante is the holder of a studentship from the FCAR-FRSQ (Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche - Fonds de Recherche en Santé du Québec) and the Canadian Heart and Stroke Foundation. P. Moreau is the holder of a CIHR scholarship. J. de C. is the holder of a career investigatorship from the J.C Edward Foundation.

Correspondence and requests for reprints to Jacques de Champlain MD, PhD, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal, CP 6128, Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7.

Tel: + 1 514 343 7562; fax: + 1 514 343 2257

e-mail: [REDACTED]

Running title: Endothelin, angiotensin and O_2^-

5248 words

ENDOTHELIN MEDIATES SUPEROXIDE PRODUCTION DURING CHRONIC ANGIOTENSIN TREATMENT

Angiotensin II and Endothelin-1 (ET) are two hormones involved in cardiovascular diseases and well known for their capacity to induce free radical generation in vascular and cardiac tissues. In addition to its pro-oxidative effect, angiotensin II can increase the synthesis of ET-1 in vascular smooth muscle cells (VSMC). Our objective was to determine whether the ET-1 synthesis in VSMC is involved in angiotensin II-induced superoxide anion production in rats. Our results show that treatments of isolated VSMC with angiotensin II and ET increased superoxide. However, this increase occurred in a bimodal fashion for angiotensin II with a fast transient production (10 minutes) and a late sustained production (6 hours), while ET-1 induced superoxide formation after a delay of 6 hours. LU302872 and BQ-123, a non-selective and a selective ETA receptor antagonists respectively, prevented angiotensin II-induced superoxide anion production only during the late phase. In contrast, BQ-3020, a selective ETB receptor antagonist, had no effect. *In vivo*, LU302872 reduced the aortic superoxide production induced by angiotensin II administered for 12 days. In conclusion, our results suggest that the superoxide generation induced by chronic angiotensin II infusion may be mediated by ET-1 acting on ETA receptors in VSMC *in vitro*. Furthermore, this effect appears to contribute to the excess superoxide production during the chronic activation of the renin-angiotensin system *in vivo*.

Keywords: Angiotensin II, ET-1, superoxide anion, oxidative stress, smooth muscle cells.

Introduction

Endothelin-1 (ET) is a 21 amino acid peptide mainly produced by endothelial cells [1]. However, other cell types, including vascular smooth muscle cells (VSMC) and cardiomyocytes have also been shown to produce this peptide [2]. In general, ET-1 is considered a local factor with autocrine and paracrine functions as most of its release occurs abuminally rather than in the circulation [3].

Strikingly, the effects of ET-1 are similar to those observed with angiotensin II, such as vasoconstriction, cellular growth and free radical generation. It has been proposed that the similarities between angiotensin II and ET-1 are due to the close interactions between both systems. Indeed, it was demonstrated that angiotensin II can stimulate ET-1 production [2]. Moreover, in a study in which rats were treated with bosentan, a non-selective ET receptors antagonist, the hemodynamic effects of low doses of angiotensin II were prevented [4]. In addition, ET is also involved in the development of angiotensin II-induced vascular hypertrophy [5].

However, the interaction between the two systems with respect to the generation of reactive oxygen species (ROS) has not been evaluated thoroughly. Angiotensin II was shown to increase the enzyme NAD(P)H oxidase activity [6-8] as well as to upregulate the synthesis of NAD(P)H subunits [9] in VSMC. On the other hand, ET-1 was shown to increase the production of ROS in various cell types such as intestinal mucosae [10], VSMC [11, 12], monocytes [13], isolated vena cava[14] and endothelial cells[15]. Recent studies have shown that ET can activate NAD(P)H oxidase *in vivo* [15, 16] and that free radicals generated in this manner could play important roles in mineralocorticoid-induced hypertension [17-19].

It was also reported that ET-1 expression can be increased by oxidative stress in coronary smooth muscle cells [20, 21] and in endothelial cells[22] and that its effects can be enhanced by superoxide anion produced from NAD(P)H oxidase [14]. Moreover, it was observed that the treatment with tempol and vitamin E, two antioxidants, could block the increase of plasma levels of ET following the chronic administration of Angiotensin II [23]. Therefore ROS appear to be important mediators in the Ang II-induced ET production.

Since angiotensin II can increase ET-1 production and since both hormones seem to be able to increase the superoxide production by activation of the NAD(P)H oxidase, our objective was to determine whether the superoxide production by angiotensin II is dependent on ET production. Our results indeed suggest that ET-1 is an important mediator of the long-term elevation of superoxide anion production induced by angiotensin II *in vivo* and *in vitro*.

Material and Methods

In vivo study

Male Sprague-Dawley rats weighting around 250g were used (Charles River Canada, St-Constant, Qc). One group (n=12) was chronically perfused for 12 days with angiotensin II (200ng/kg/min, Sigma Chemical Co., St-Louis) through a subcutaneously implanted Alzet 2002 osmotic pumps (Durect corporation, Palo Alto) as described in a previous study [24]. Pumps were inserted after anaesthesia with fentanyl/midazolam (2.7ml/kg) given intraperitoneally. A treatment with LU302872 (30mg/kg/day), an

antagonist of the ET receptors ETA and ETB, was administered with the rat's chow simultaneously with angiotensin II (n=12). The dose of LU302872 for rats was determined according to previous experiments [25, 26]. The control group was implanted with osmotic pumps containing the vehicle solution (n=8). Finally, one group was left completely untreated (n=4). The arterial pressure of the rats was measured by tail cuff photoplethysmography. Superoxide anion production was measured with the lucigenin method described previously [27, 28]. Briefly, rats were decapitated after light anaesthesia with CO₂ and the aorta was cleaned in Krebs-Hepes buffer. Approximately 5mg of tissue were placed in 2 ml Krebs-Hepes buffer in scintillation vials containing a lucigenin (5µM) solution (Sigma Chemical Co., St-Louis) and the emitted luminescence was measured with a Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer, St-Laurent) as previously described [29]. The average luminescence value was estimated, the background value was subtracted and the result was divided by the wet weight (mg) of the samples. Moreover, the activation of NAD(P)H oxidase activity in the samples was assessed by adding NADH 10⁻⁴M (Sigma Chemical Co.) in the vials before counting. Basal superoxide-induced luminescence was then subtracted from the luminescence value induced by NADH. The investigation was conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and monitored by an institutional care committee.

In vitro experiments

Untreated rats were decapitated after light anaesthesia with CO₂ and the aorta was transferred to sterile dishes with culture medium. Aortic vascular smooth muscle cells

were isolated from male Sprague-Dawley rats (225-250 g) by enzymatic digestion of aortas with collagenase and elastase (Sigma Chemical Co., St-Louis) as previously described [30, 31]. Cells were grown in DMEM with 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin-streptomycin) (Invitrogen Canada Inc, Ontario) in a controlled environment at 37°C and 5% CO₂.

Cells treatments and superoxide measurements.

Cells were treated with angiotensin II (10^{-6} M) and ET (10^{-7} M) for different periods (10 minutes to 48 hours). Cells were also treated with angiotensin II in combination with LU302872 (10^{-7} M) or with an ETA receptor antagonist (BQ-123, 10^{-7} M), an ETB receptor antagonist (BQ-3020, 10^{-7} M), an inhibitor of DNA and protein synthesis (actinomycin D, 1 µg/ml) (Sigma Chemical Co., St-Louis) or an inhibitor of NAD(P)H oxidase (Apocynin (acetovanillone), 10^{-4} M).

Superoxide anion production was measured with the lucigenin method described above and adapted to cell cultures. Briefly, cells were suspended with trypsin 0.05 % (Invitrogen Canada Inc, Ontario) and washed in oxygenated Krebs-Hepes buffer after centrifugation. Cells were counted with a cytometer and approximately 10^6 cells were placed in 2 ml Krebs-Hepes buffer in scintillation vials containing a lucigenin (5 µM) solution. The luminescence value was measured as described for the aorta. The results were adjusted according to the protein content (mg) of the samples.

ET-1 Immunoassay (ELISA)

VSMC were grown in 6 well plates until confluence and treated with 10^{-6} M angiotensin II in DMEM with 1% FBS for periods varying between 10 minutes to 48 hours. Cell culture supernatants were centrifuged to remove cell debris, then frozen at -70°C until the next day. ET-1 was measured with an ELISA kit provided by Biomedica Gruppe (Wien, Germany). Readings were done with a 96 wells plate reader Lumistar Galaxy from BMG Technologies (Offenburg, Germany). The measurements were also performed on isolated aortas from Sprague-Dawley rats. The thoracic aortas were sampled under sterile condition and carefully cleaned in culture media and the conjunctive tissue was removed. The aorta was cut into 2 pieces of approximately 1 cm and the endothelium was removed from one piece by gently rolling the vessel on a sterile wet cheese-cloth paper with the help of a metal rod. The samples were then transferred into culture dishes with 2 ml of DMEM with 5% FBS for 48hours. The ET-1 release was measured in the culture media. The value obtained were divided by the wet weight of the samples.

Nox1 and Nox4 expression in VSMC and aortas

For the assessment of the expression of Nox1 and Nox4, aortas were first frozen and crushed in liquid nitrogen while cells were washed three times with a phosphate buffer before adding the lysis buffer. Lysis and western blots were performed as described previously [32] with 50 μg of proteins loaded on gels. Primary and secondary antibodies were used at a 1:200 and 1:2000 dilution. Membranes were exposed to X-Omat blue films (Kodak, Rochester, New York, USA) for 5 minutes. Gels were scanned and densitometry of the bands was assessed using Scion image 4.0.2 (Scion Corporation,

Frederick, Maryland, USA). Protein loading on the gels was controlled by monitoring the expression of β -actin. Preincubation with the antigenic peptide in excess was used to determine the specificity of the signal. Results for each condition were divided by control values to estimate the magnitude changes compared to controls. Antibodies and blocking peptides were purchased from Santa Cruz Biotechnology, California. Reagents used in buffers were purchased from Sigma Chemical Co.

Statistical analysis

Values are expressed as the mean \pm SEM. The data were analysed using Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni or the Dunnett post-test (for fig.4) with the program GraphPad Prism version 3.00 for Windows (GraphPad Software inc.). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Immunoassay of ET-1 in cell culture medium

The basal production of ET-1 released in the culture medium by vascular smooth muscle cells was 1.64 ± 0.15 fmol/ml. This basal production did not vary significantly after a 48 hours incubation in normal cell culture media. Treatments with 10^{-6} M angiotensin II for 10 minutes, 1 hour and 3 hours did not modify significantly this production. However, after 6 hours, 24 hours and 48 hours of incubation with angiotensin II, the production of ET-1 significantly increased by 78, 95 and 177% respectively ($p < 0.05$) (figure 1).

Isolated aortas with intact endothelium produced 142% more ET-1 than denuded aortas (147 ± 47 fmol/ml compared to 60 ± 5 fmol/ml for 1 gram of tissue), ($p < 0.05$).

Superoxide anion measurements

The basal production of superoxide anion by cultured smooth muscle cells (5205 ± 2259 cpm/mg) was increased by 372% within 10 min of treatment with angiotensin II 10^{-6} M and started to decline after 20 minutes (213%), followed by a return to initial levels within one hour. However, a second late increase was observed after 6 hours (180%), 24 hours (285%) and 48 hours (244%) of incubation with angiotensin II (figure 2A) ($p < 0.05$).

Treatments with ET-1 10^{-7} M did not increase the basal superoxide anion production (4284 ± 1755 cpm/mg) after 10 minutes, 20 minutes or 1 hour but did increase the production at 3 hours (250%), 6 hours (452%), 24 hours (402%) and 48 hours (321%) after the beginning of treatment ($p < 0.05$) (figure 2B).

The combination of LU283072 (an ETA and ETB antagonist) with angiotensin II treatment did not significantly change the superoxide production after 10 minutes of treatment (21287 ± 7674 cpm/mg) but prevented the increase of superoxide production by 89% after 6 hours of treatment. The treatment with BQ-123 (an ETA antagonist) had a similar effect and prevented by 56% the angiotensin-induced superoxide anion production whereas BQ-3020 (an ETB blocker) had no effect ($p < 0.05$) (figure 3A).

Actinomycin D, which blocks protein synthesis, also had no effect in combination with angiotensin II in the early phase after 10 minutes but prevented by 54%, the angiotensin-induced superoxide production after 6 hours ($p<0.05$) (figure 3B).

Apocynin prevented the increase of superoxide anion observed after 6 hours up to 48 hours of ET treatment (figure 4). Moreover, the expression of Nox1 (figure 5A) and Nox4 (figure 5B) in the cultured VSMC treated with angiotensin II were increased by 1.76 and 3.4 folds respectively. These increases were prevented by a combined treatment with BQ-123 ($p<0.05$).

Effects of LU302872 treatment in angiotensin II-treated rats.

Chronic treatment with angiotensin II increased systolic blood pressure from 131.6 ± 5.5 to 180.3 ± 4.9 mmHg ($p<0.05$). The concomitant administration of LU302872 attenuated this increase only at the 12th day of treatment (161.6 ± 7.6 mmHg) ($p<0.05$) (figure 6A). Angiotensin II increased the superoxide anion production by 129% and this increase was partially prevented by LU302872 to only 42% (figure 6B) while a treatment with LU302872 alone had no effect. The NAD(P)H oxidase subunits Nox1 and Nox4 expressions were also increased during angiotensin II therapy by 2 and 3.9 folds. LU302872 prevented the increase of Nox4 expression (figure 7A) but had no effect for Nox1 (figure 7B).

Discussion

Although studies have independently demonstrated the properties of angiotensin II [6-9] and ET-1 [15, 16] to induce superoxide production through NAD(P)H oxidase activation, the direct interaction between the two hormones on the superoxide anion production was never investigated. It was previously reported that angiotensin II can stimulate ET-1 production in smooth muscle cells [2] and those observations could be confirmed in our studies in VSMC. Interestingly, our time course study showed an increase of ET-1 release in the culture media only after approximately 6 hours of treatment with angiotensin II (figure 1) and not earlier. Angiotensin II-stimulated ET-1 release was also reported *in vivo* in rats treated with angiotensin II and an ETA receptor antagonist [33]. In our *in vitro* experiments the initial increase of oxidative stress produced by angiotensin II could be involved to this production of ET. This interpretation is in line with previous reports showing that peroxide or superoxide anion can increase prepro-endothelin mRNA expression in VSMC after 1 to 6 hours [20, 21]. However, the physiological significance of the ET-1 production by smooth muscle cells can be questioned since it was shown that its production is 50 to 100 times more important in endothelial cells in culture [34]. On the other hand, the production of endothelium-derived ET-1 might not be as high *in vivo* since it was reported that endothelial cells produce less ET-1 in the presence of VSMC [35]. Our observations in isolated aortas show that indeed endothelium account for the major part of ET release, however, when the endothelium was removed, the aorta still retained 40% of its capacity to synthesize ET-1.

We found that the kinetic of superoxide production following treatments with either angiotensin II or ET-1 differed significantly between both vasoconstrictors. For

angiotensin II, the superoxide production increases in a bimodal fashion reaching a first peak within 10-15 minutes of treatment and a second one later after 4-6 hours. In addition, it was observed that the superoxide production fell near controls values between 1 to 3 hours of treatment. This pattern suggests the existence of two phases of superoxide anion production triggered by angiotensin II which may possibly involve two different mechanisms.

In contrast to angiotensin II, the treatment of VSMC with ET-1 was characterised only by a rise in superoxide production that was observed only after 3 hours of treatment and lasting up to 48 hours. Since it was shown that ET-1 is only produced after a few hours of VSMC treatment with angiotensin II, it is unlikely that the fast oxidative effect of angiotensin II is ET-dependent. However, since the late oxidative effect occurred around the same period than the angiotensin-induced increase in ET-1, it is most likely that the long-lasting stimulation of superoxide production by angiotensin II is mediated by the angiotensin-induced production of ET-1.

To verify the hypothesis of an early ET-independent phase and a late, long-lasting ET dependent phase, the effect of LU302872, a non-selective ET receptors antagonist, was evaluated in cells culture. These studies revealed that LU302872 did not prevent the early angiotensin-induced superoxide production but that it did efficiently prevent the late superoxide production proving that the early phase of the Ang II-induced superoxide anion production is independent of ET-1. Moreover, Ang II did not seem to increase ET-1 production in smooth muscle cells during the first 3 hours of treatment (fig.1). It is likely that Ang II activates NAD(P)H oxidase through a fast pathway possibly involving other effectors such as c-src, EGF receptors or PI3 kinase but those pathways are down-

regulated after 1-3 hours (fig. 2A). After that time, superoxide production rose again in association with protein synthesis (fig. 3B) and could then be totally prevented by ETA antagonists. It is thus possible that Ang II induces ET-1 synthesis after a few hours of stimulation and that the relative contribution of ET-1 in the sustained Ang II-induced superoxide production probably accounts for the major part of the superoxide production at that time.

The use of the more selective antagonists BQ-123 and BQ-3020 has permitted to determine that the long-term angiotensin-induced superoxide production is dependent on ETA receptors. Indeed, the ETA antagonist BQ-123 prevented in great part the increase of superoxide anion while the ETB antagonist BQ-3020 had no significant effect. Our observations are in agreement with a previous study, which reported that the superoxide production induced by ET is mediated by ETA receptors [11]. In addition, the preventive effects of apocynin (acetovanillone) on the ET-induced superoxide production confirmed that the superoxide production induced by ET-1 was mediated through an activation of NAD(P)H oxidase. Finally, angiotensin II increased the expression of Nox1 and 4, two homologs of the p91-phox subunit of the NAD(P)H oxidase, in VSMC and this increase was prevented by blocking ETA receptors supporting the hypothesis of the involvement of endothelin-1 in the angiotensin II-stimulated production of superoxide.

The relevance of the *in vitro* interaction could also be demonstrated *in vivo* in the angiotensin-induced model of hypertension. Indeed, the blood pressure and superoxide production are greatly and concomitantly increased in that model as previously reported [36, 37]. To assess the role of ET in that hypertension model, the blockade of ET receptors by LU302872 was studied. It was found to prevent only partially the increase

of blood pressure suggesting the contribution of other mechanisms beside the synthesis of ET-1 for the elevation of blood pressure, confirming previous reports [38, 39]. Another study using rats infused with angiotensin II also demonstrated a prevention of the rise of blood pressure by a treatment with the ETA receptor antagonist, PD 155080 [33]. Despite a partial effect on arterial pressure, blockade of both ET receptors achieved a near complete prevention in the rise of basal superoxide production in vascular tissues of angiotensin II-treated rats.

The increased expression of Nox4 measured in aortas from rats treated with angiotensin II was also prevented by LU302872, but this was not the case with Nox1. These results are compatible with others studies where Nox1 and 4 were found to be increased in smooth muscles following a treatment with angiotensin *in vivo* and *in vitro* [40,41]. Also, hypertension in SHR rats was associated with overexpression of Nox4 in cerebral arteries with no changes in the expression of Nox1 [42]. Although, it was suggested that Nox1 could play a role in the early phase of superoxide production by angiotensin II [43], we can hypothesise that Nox4 may be implicated in this mechanism after a long exposure to angiotensin II.

In conclusion, this study demonstrates that ET-1 appears to be an intermediary factor for the stimulation of the vascular superoxide anion production induced by angiotensin II infusion. It is thus postulated that blocking the ET system could be a therapeutic avenue to reduce the oxidative stress induced by the chronic elevation of renin-angiotensin system activity.

Acknowledgement

The authors would like to thank Diane Papin and Adil El Midaoui for their expert technical assistance and Carole Champagne for her editorial assistance.

List of Abbreviations

ROS, reactive oxygen species; VSMC, Vascular smooth muscle cells; NAD(P)H, dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ET, Endothelin.

References

1. Miyauchi, T.; Masaki, T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol*, **61**:391-415 ; 1999.
2. Hahn, A.W.; Resink, T.J.; Scott-Burden, T.; Powell, J.; Dohi, Y.; Buhler, F.R. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul*, **1**: 649-59; 1990.
3. Wagner, O.F.; Christ, G.; Wojta, J.; Vierhapper, H.; Parzer, S.; Nowotny, P.J.; Schneider, B.; Waldhausl, W.; Binder, B.R. Polar secretion of ET-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, **267**:16066-8; 1992.
4. Balakrishnan, S.M.; Wang, H.D.; Gopalakrishnan, V.; Wilson, T.W.; McNeill, J.R. Effect of an endothelin antagonist on hemodynamic responses to angiotensin II. *Hypertension*, **28**: 806-9; 1993.
5. Moreau, P.; d'Uscio, L.V.; Shaw, S.; Takase, H.; Barton, M.; Luscher, T.F. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation*, **96**:1593-7; 1997.

6. Griendling, K.K.; Minieri, C.A.; Ollerenshaw, J.D.; Alexander, R.W.
Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured
vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **74**: 1141-8; 1994.
7. Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B.A.; Griendling,
K.K.; Harrison, D.G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases
vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation.
Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, **97**:1916-23; 1996.
8. Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. Increased generation of superoxide by angiotensin II
in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of
phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens*,
19:1245-54; 2001.
9. Touyz, R.M.; Chen, X.; Tabet, F.; Yao, G.; He, G.; Quinn, M.T.; Pagano, P.J.;
Schiffrin, E.L.; Expression of a functionally active gp91phox-containing
neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance
arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*, **90**:1205-13; 2002.
10. Oktar, B.K.; Coskun, T.; Bozkurt, A.; Yegen, B.C.; Yuksel, M.; Haklar, G.; Bilsel,
S.; Aksungar, F.B.; Cetinel, U.; Granger, D.N.; Kurtel, H. ET-1-induced PMN
infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine. *Am J Physiol*
Gastrointest Liver Physiol, **279**:G483-91; 2000.
11. Wedgwood, S.; Dettman, R.W.; Black, S.M. ET-1 stimulates pulmonary arterial
smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J*
Physiol Lung Cell Mol Physiol, **281**:L1058-67; 2001.

12. Wedgwood, S.; McMullan, D.M.; Bekker, J.M.; Fineman, J.R.; Black, S.M. Role for ET-1-induced superoxide and peroxynitrite production in rebound pulmonary hypertension associated with inhaled nitric oxide therapy. *Circ Res*, **89**:357-64; 2001.
13. Huribal, M.; Kumar, R.; Cunningham, M.E.; Sumpio, B.E.; McMillen, M.A. Endothelin-stimulated monocyte supernatants enhance neutrophil superoxide production. *Shock*, **1**:184-7; 1994.
14. Li, L. ; Watts, S.W.; Banes, A.K.; Galligan, J.J.; Fink, G.D.; Chen, A.F. NADPH oxidase-derived superoxide augments ET-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*, **42**:316-21; 2003.
15. Duerschmidt, N.; Wippich, N.; Goettsch, W.; Broemme, H.J.; Morawietz, H. ET-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **269**:713-7; 2000.
16. Fei, J.; Viedt, C.; Soto, U.; Elsing, C.; Jahn, L.; Kreuzer, J. ET-1 and smooth muscle cells: induction of jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**:1244-9; 2000.
17. Li, L.; Chu, Y.; Fink, G.D.; Engelhardt, J.F.; Heistad, D.D.; Chen, A.F. ET-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*, **42**:997-1003; 2003.
18. Li, L.; Fink, G.D.; Watts, S.W.; Northcott, C.A.; Galligan, J.J.; Pagano, P.J.; Chen, A.F. ET-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*, **107**:1053-8; 2003.

19. Bayorh, M.A.; Ganafa, A.A.; Socci, R.R.; Silvestrov, N.; Abukhalaf, I.K. The role of oxidative stress in salt-induced hypertension. *Am J Hypertens*, **17**:31-6; 2004.
20. Ruef, J.; Moser, M.; Kubler, W.; Bode, C. Induction of ET-1 expression by oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Pathol*, **10**:311-5; 2001.
21. Kahler, J.; Ewert, A.; Weckmuller, J.; Stobbe, S.; Mittmann, C.; Koster, R.; Paul, M.; Meinertz, T.; Munzel, T. Oxidative stress increases ET-1 synthesis in human coronary artery smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, **38**:49-57; 2001.
22. Saito, T.; Itoh, H.; Chun, T.H.; Fukunaga, Y.; Yamashita, J.; Doi, K.; Tanaka, T.; Inoue, M.; Masatsugu, K.; Sawada, N.; Sakaguchi, S.; Arai, H.; Mukoyama, M.; Tojo, K.; Hosoya, T.; Nakao, K. Coordinate regulation of endothelin and adrenomedullin secretion by oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**:H1364-71; 2001.
23. Ortiz, M.C.; Manriquez, M.C.; Romero, J.C.; Juncos, L.A. Antioxidants block angiotensin II-induced increases in blood pressure and endothelin. *Hypertension*, **38**:655-9; 2001.
24. Herizi, A.; Jover, B.; Bouriquet, N.; Mimran, A. Prevention of the cardiovascular and renal effects of angiotensin II by endothelin blockade. *Hypertension*, **31**:10-4; 1998.
25. Wolf, S.C.; Amend, T.; Risler, T.; Amann, K.; Brehm, B.R. Influence of endothelin receptor antagonists on myocardial protein kinase C isoforms in uraemic cardiomyopathy. *Clin Sci (Lond)*, **103**:276S-279S; 2002.

26. Wolf, S.C.; Gaschler, F.; Brehm, S.; Klaussner, M.; Amann, K.; Risler, T.; Brehm, B.R. Endothelin-receptor antagonists in uremic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol*, **36**:S348-50; 2000.
27. Munzel, T.; Sayegh, H.; Freeman, B.A.; Tarpey, M.M.; Harrison, D.G. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest*, **95**:187-94; 1995.
28. Ohara, Y.; Peterson, T.E.; Harrison, D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*, **91**:2546-51; 1993.
29. Zalba, G.; Beaumont, F.J.; San Jose, G.; Fortuno, A.; Fortuno, M.A.; Etayo, J.C.; Diez, J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **35**:1055-61; 2000.
30. Schiffrin, E.L.; Poissant, L.; Cantin, M.; Thibault, G. Receptors for atrial natriuretic factor in cultured vascular smooth muscle cells. *Life Sci*, **38**:817-26; 1986.
31. Wu, L.; de Champlain, J. Inhibition by cyclic AMP of basal and induced inositol phosphate production in cultured aortic smooth muscle cells from Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, **14**:593-9; 1996.
32. Matrougui, K.; Eskildsen-Helmond, Y. ; Fiebeler, A. ; Henrion, D. ; Levy, B. ; Tedgui, A. Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension*, **36**: 617-21; 2000.

33. Rajagopalan, S.; Laursen, J.B.; Borthayre, A.; Kurz, S.; Keiser, J.; Haleen, S.; Giaid, A.; Harrison, D.G. Role for Endothelin-1 in Angiotensin II– Mediated Hypertension. *Hypertension*, **30**:29-34; 1997.
34. Kanse, S.M.; Takahashi, K.; Warren, J.B.; Perera, T.; Porta, M.; Ghatei, M.; Bloom, S.R. Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, **17**:S113-6; 1991.
35. Di Luozzo, G.; Bhargava, J.; Powell, R.J. Vascular smooth muscle cell effect on endothelial cell ET-1 production. *J Vasc Surg*, **31**:781-9; 2000.
36. Laplante, M.A.; Wu, R. ; El Midaoui, A.; de Champlain, J. NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*, **21**:927-936; 2003.
37. Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B.A.; Griending, K.K.; Harrison, D.G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, **97**:1916-23; 1996.
38. Fica, S.; Herizi, A.; Mimran, A.; Jover, B. Endothelin blockade in angiotensin II hypertension: prevention and treatment studies in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **28**:1100-3; 2001.
39. Herizi, A.; Jover, B.; Bouriquet, N.; Mimran, A. Prevention of the cardiovascular and renal effects of angiotensin II by endothelin blockade. *Hypertension*, **31**:10-4; 1998.
40. Higashi, M.; Shimokawa, H.; Hattori, T.; Hiroki, J.; Mukai, Y.; Morikawa, K.; Ichiki, T.; Takahashi, S.; Takeshita, A. Long-term inhibition of Rho-kinase

suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res*, **93**:767-75; 2003.

41. Wingler, K.; Wunsch, S.; Kreutz, R.; Rothermund, L.; Paul, M.; Schmidt, HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, **31**:1456-64; 2001.
42. Paravicini, T.; Chrissobolis, S.; Drummond, G.; Sobey, C. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke*, **35**: 584-9; 2004.
43. Lassegue, B.; Sorescu, D.; Szocs, K.; Yin, Q.; Akers, M.; Zhang, Y.; Grant, SL.; Lambeth, JD.; Griendling, KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*, **88**:888-94; 2001.

Figures

1)

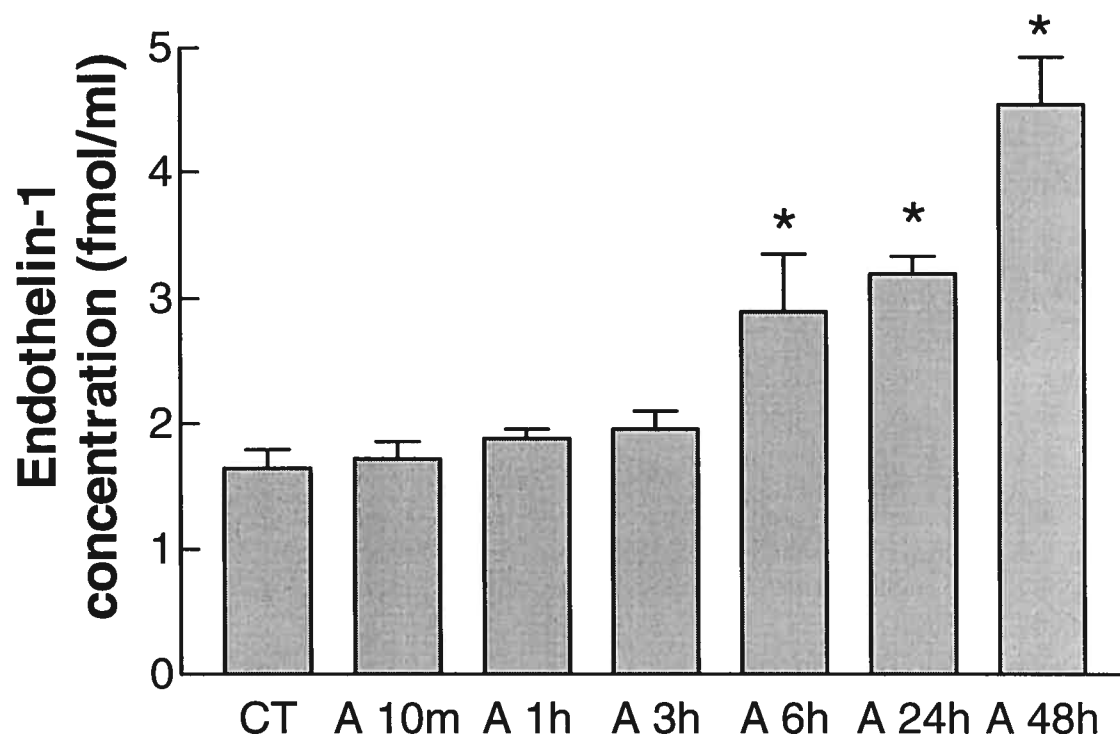
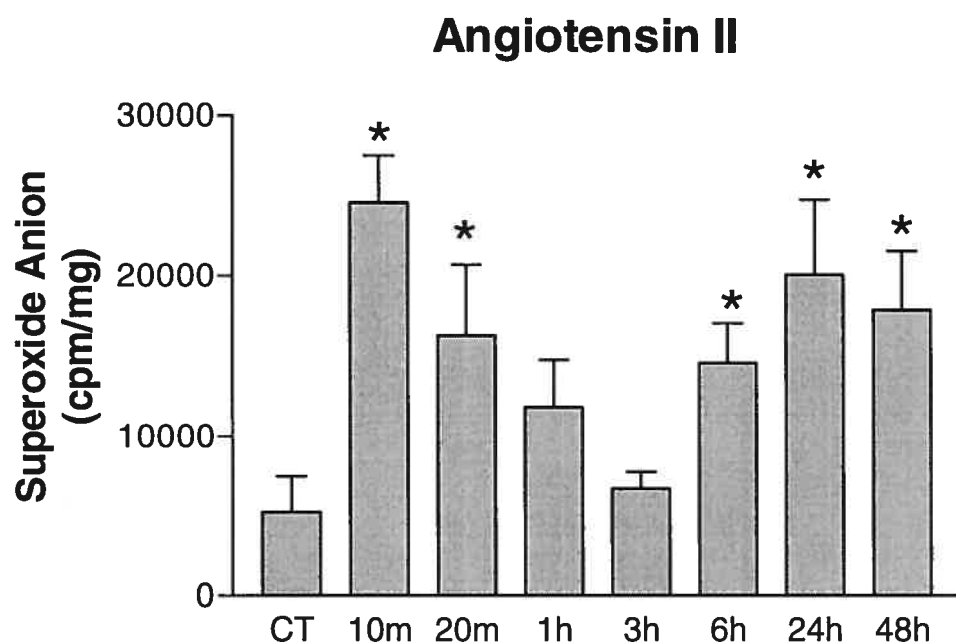


Figure 1) ET-1 concentration in isolated cultured VSMC chronically incubated with 10^{-6} M angiotensin II for periods varying between 10min to 48 hours. CT, controls; A, Angiotensin II. Data are presented as mean \pm SEM (n=6). *Significantly different from control (p<0.05).

2A)



2B)

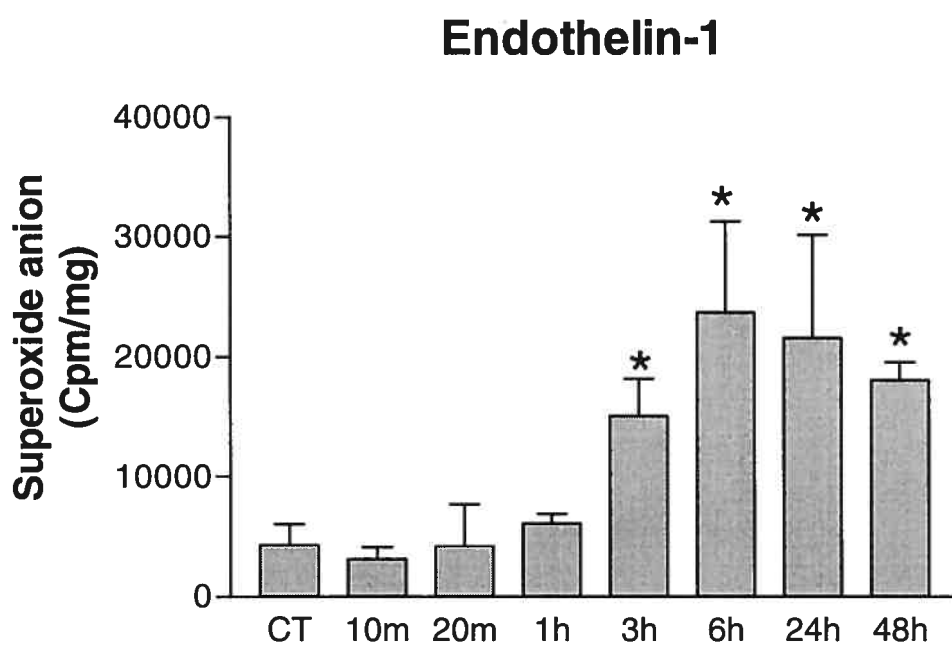
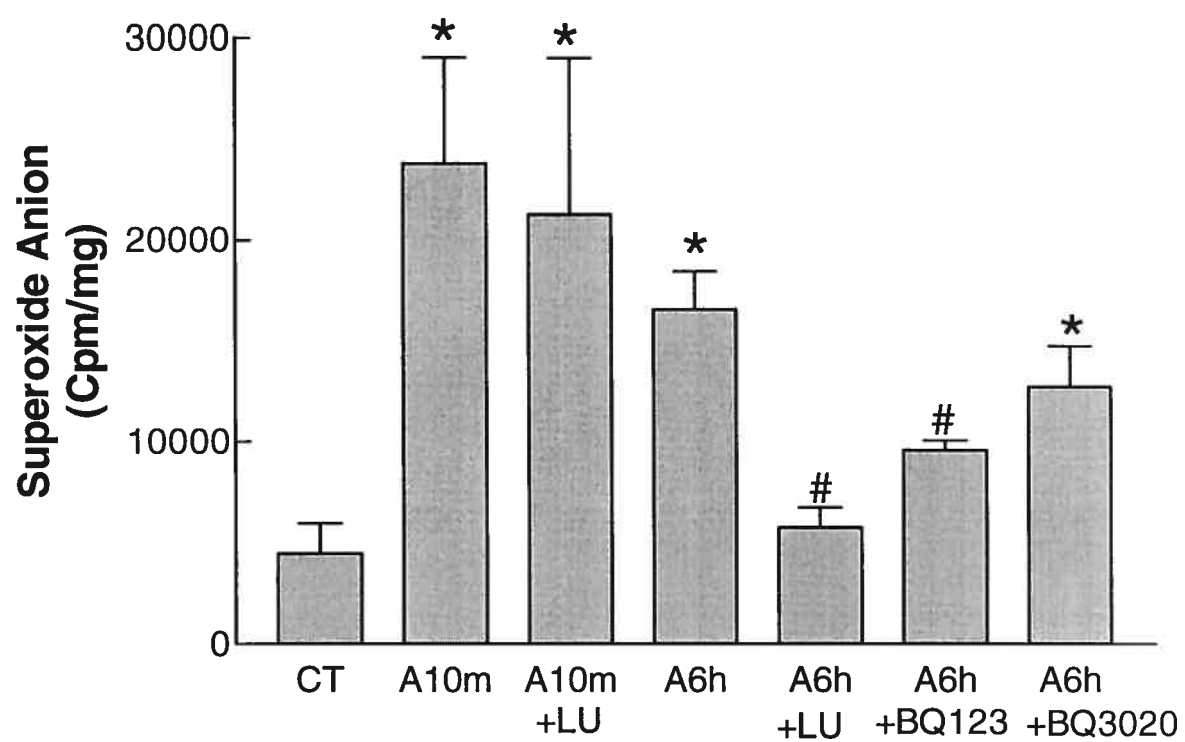


Figure 2A) Time-course for the superoxide anion production in VSMC chronically incubated with 10^{-6} M angiotensin II. **2B)** Time-course for the superoxide anion production in VSMC chronically incubated treated with 10^{-7} M ET-1. CT, controls. Data are presented as mean \pm SEM (n=5 to 8). *Significantly different from control (p<0.05).

3A)



3B)

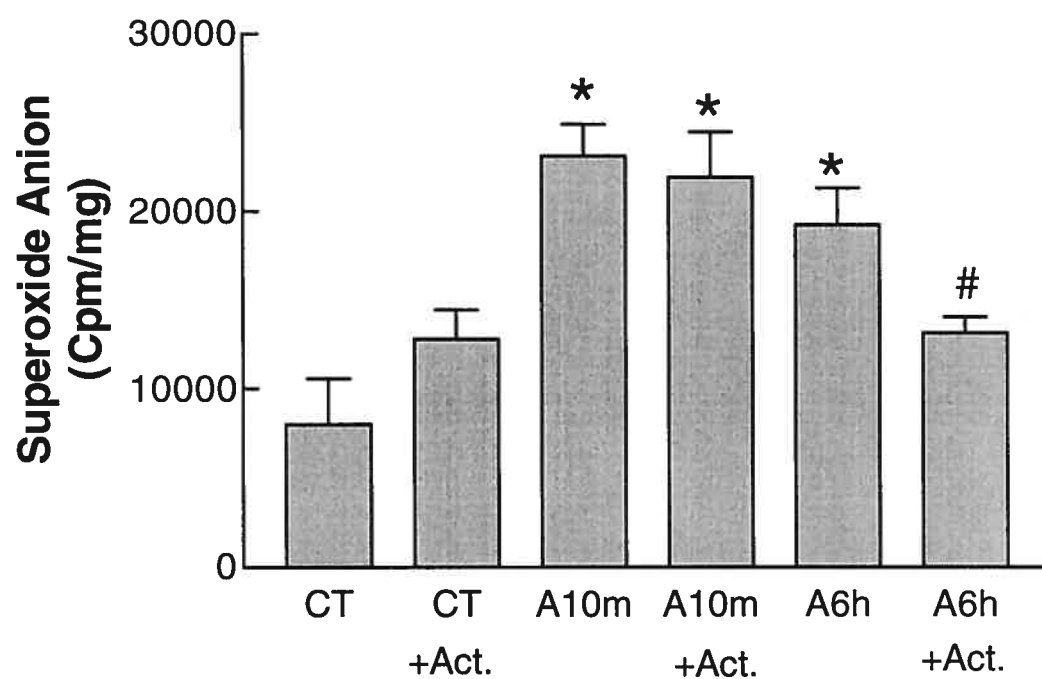


Figure 3A) Superoxide anion production in VSMC treated with 10^{-6} M angiotensin II in combination with LU283072 10^{-7} M or BQ-123 10^{-7} M or BQ-3020 10^{-7} M for 10 minutes and 6 hours. CT, controls; A, Angiotensin II; LU, LU283072. Data are presented as mean \pm SEM (n=6). *Significantly different from control (p<0.05).

#Significantly different from Angiotensin 6h (p<0.05).

B) Superoxide anion production in VSMC treated with 10^{-6} M angiotensin II in combination with actinomycin D 1 μ g/ml for 10 minutes and 6 hours. CT, controls; A, Angiotensin II; Act., Actinomycin D. Data are presented as mean \pm SEM (n=6).

*Significantly different from control (p<0.05). #Significantly different from Angiotensin 6h (p<0.05).

4)

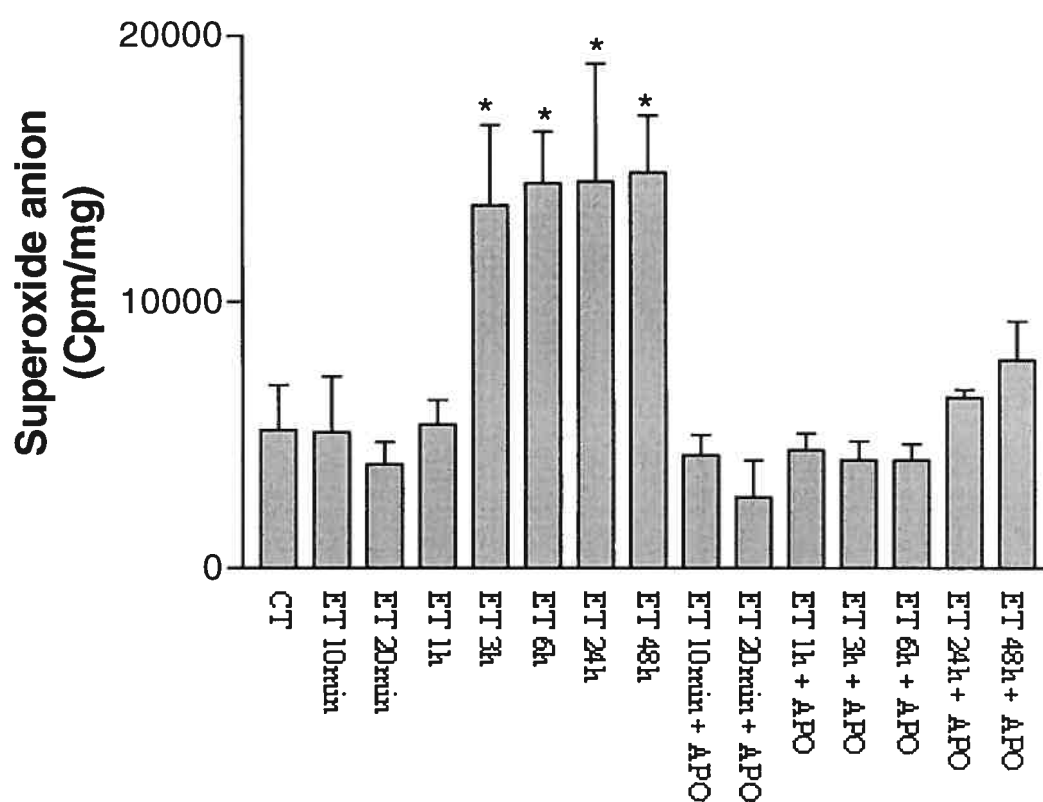
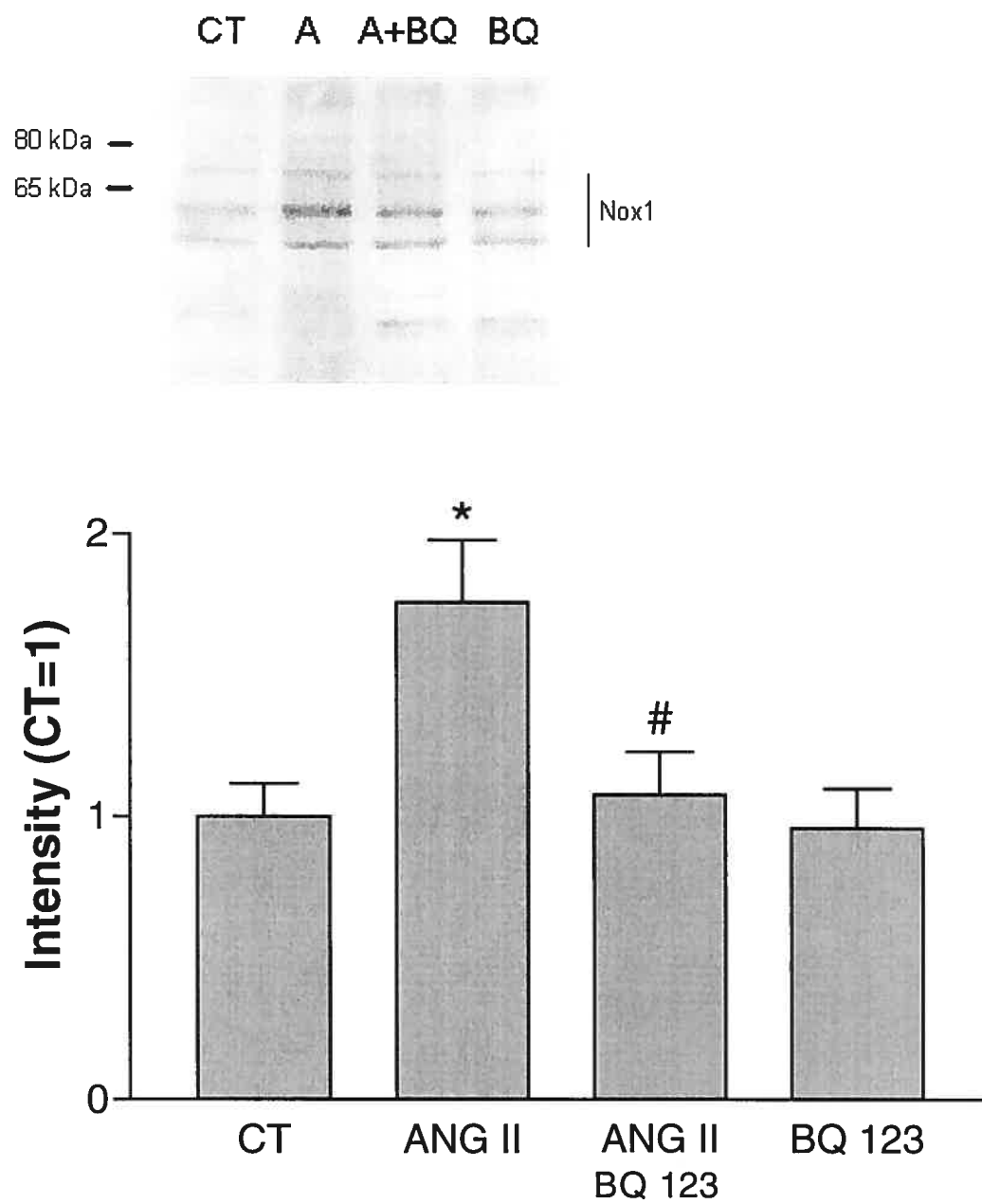


Figure 4) Superoxide anion production in VSMC treated with ET-1 for 6 hours with and without acetovanillone. APO, Acetovanillone (apocynin). Data are presented as mean \pm SEM (n=5). *Significantly different from control (p<0.05).

5A)



5B)

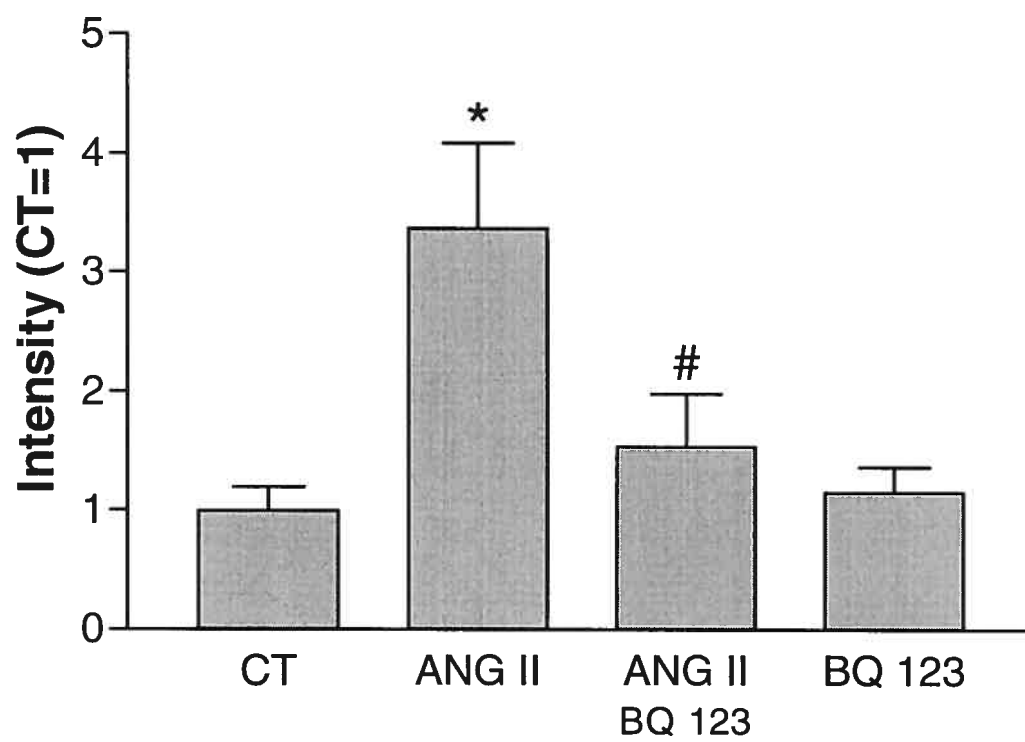
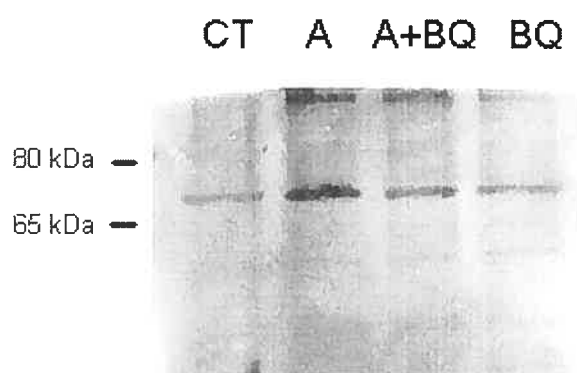
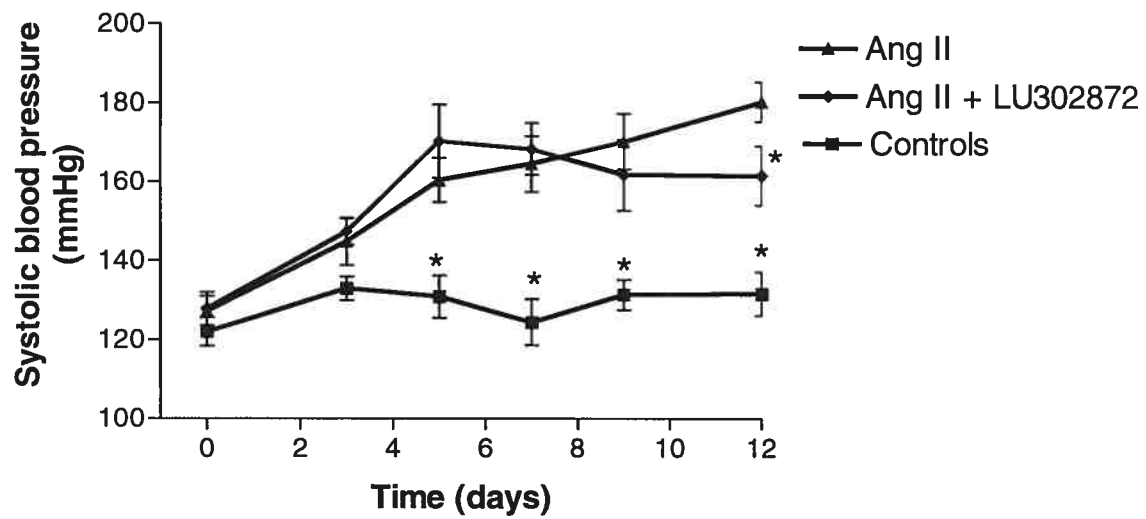


Figure 5A) Nox1 and **(B)** Nox4 expression in VSMC treated with angiotensin II 10^{-6} M combined with the ETA receptor blocker, BQ-123 10^{-7} M, for 6 hours. Nox1 antibody revealed 3 bands around 65kDa that were suppressed by preincubation with the antigenic peptide. Ang II or A, Angiotensin II; BQ, BQ-123. Data are presented as mean \pm SEM (n=5). The blot shown is representative of 5 experiments. *Significantly different from control (p<0.05). #Significantly different from Angiotensin (p<0.05).

6A)



6B)

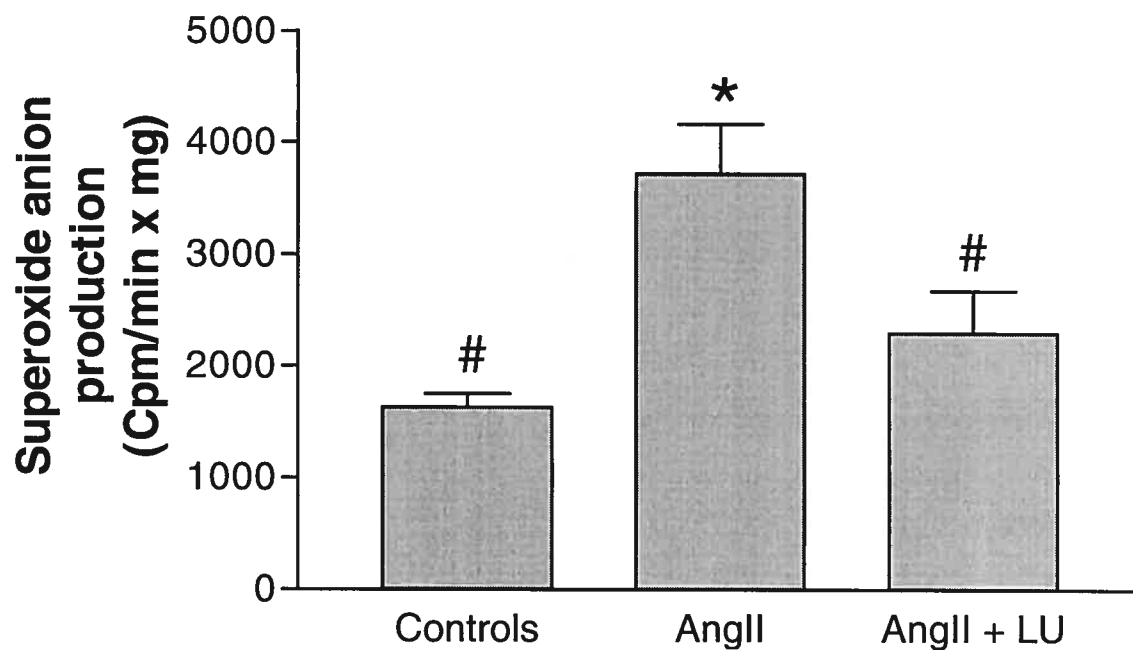
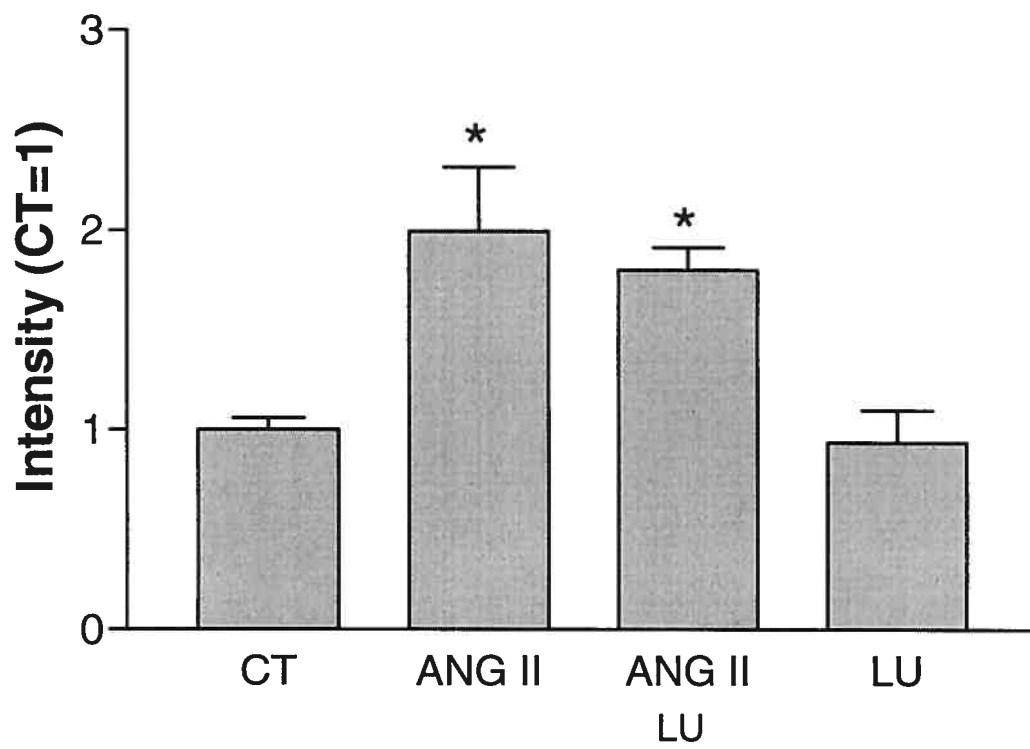
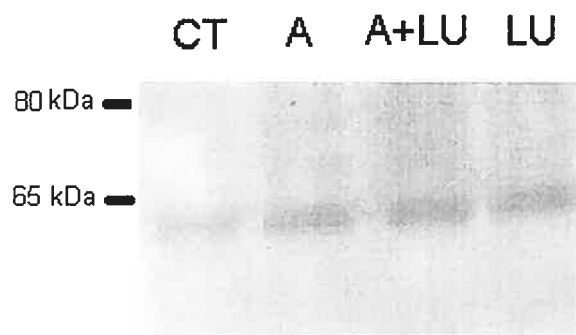


Figure 6A) Effect of an ETA, ETB receptor blocker, LU302872 (30mg/kg/day), on the development of hypertension and on the superoxide anion (**B**) production in the aorta of rats treated for 12 days with angiotensin II (200ng/kg/min). Rats were observed for a period of 12 days and the blood pressure was measured every other day with a tail cuff method. Ang II, Angiotensin II; LU, LU283072. Data are presented as mean \pm SEM (n=8 to 12). *Significantly different from control ($p<0.05$). #Significantly different from Angiotensin ($p<0.05$).

7A)



7B)

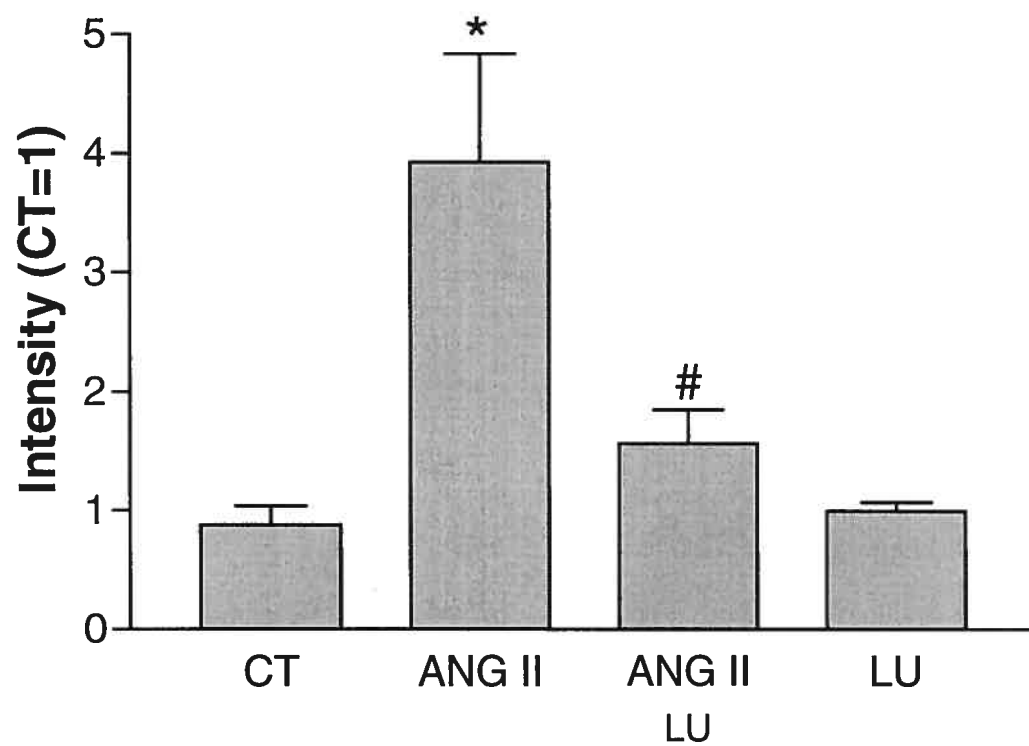
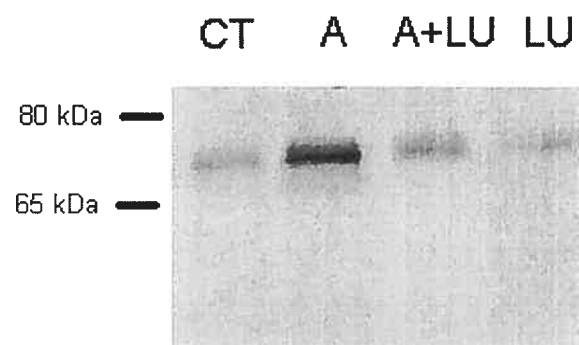


Figure 7A) Nox1 and **(B)** Nox4 expression in aorta of rats treated for 12 days with angiotensin II (200ng/kg/min) alone and with LU283072 (30mg/kg/day). Ang II and A, Angiotensin II; LU, LU283072. Data are presented as mean \pm SEM n=5. The blot shown was representative of 5 experiments. *Significantly different from control (p<0.05). #Significantly different from Angiotensin II (p<0.05).

CHAPITRE V – ARTICLE SCIENTIFIQUE**OMEGA-3 AND OMEGA-6 FATTY ACIDS IN VASCULAR SUPEROXIDE
PRODUCTION IN RATS**

Marc-André Laplante, Rong Wu, Zayna Mougharbel, Jennifer Wang, Jacques de Champlain

Omega-3 and omega-6 fatty acids in vascular superoxide production in rats

Soumi dans Free Radicals in Biology and Medicine

Contributions respectives

Le projet a été supervisé par le Dr Jacques de Champlain qui a fourni le matériel, les locaux et l'encadrement nécessaire à la réalisation des expériences. L'idée initiale du projet a été suggérée par Marc-André Laplante et Zayna Mougharbel. Le déroulement expérimental a ensuite été élaboré par Marc-André Laplante sous la supervision de Jacques de Champlain. La mise au point des protocoles et les expériences ont été effectuées par Marc-André Laplante avec l'assistance de Rong Wu qui a mis au point le dosage de l'anion superoxyde, de Zayna Mougharbel et Jennifer Wang qui ont effectué des mesures d'anion superoxyde dans les cellules en cultures. L'article a été écrit par Marc-André Laplante avec la révision de Rong Wu. L'article a été revu et corrigé par Jacques de Champlain.

Omega-3 and omega-6 fatty acids in vascular superoxide production in rats

Marc-André Laplante*, Rong Wu*, Zayna Mougharbel, Jennifer Wang, Jacques de Champlain*

Research Group on Autonomic Nervous System

*Département de Physiologie and Institut de Recherches Cliniques de Montréal.

Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

This research was supported by a grant from Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to J. de Champlain. M-A. Laplante is the holder of a studentship from the Canadian Heart and Stroke Foundation. J. de C. is the holder of a career investigatorship from the J.C. Edward Foundation.

Correspondence and requests for reprints to Jacques de Champlain MD, PhD,
Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal, CP 6128,
Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7.

Tel: + 1 514 343 7562; fax: + 1 514 343 2257

e-mail: [REDACTED]

Running title : O_2^- production by omega-6

Omega-3 and omega-6 fatty acids in vascular superoxide production in rats

Abstract

Omega-3 and 6 (Ω -3, Ω -6) are fatty acids used as substrate for arachidonic acid-dependent pathways known for their capacity to produce free radicals. In the present study, the oxidant properties of arachidonic acid (Ω -6) (AA) and eicosapentaenoic acid (Ω -3) (EPA) or docosahexaenoic acid (Ω -3) (DHA) in vascular smooth muscle cells and aortas from Sprague-Dawley rats were measured. Four groups of Sprague-Dawley rats were supplemented with canola oil, AA, docosahexaenoic acid (Ω -3) (DHA) and a combination of AA and DHA.

Cells treated with AA produced more superoxide anion compared to untreated cells ($p < 0.01$). EPA or DHA in combination with AA prevented this oxidant effect. Inhibition of 12-lipoxygenase with caffeic acid or baicalein ($p < 0.001$) or inhibition of cytochromes p450 2C by sulfaphenazole ($p < 0.01$) prevented the increased superoxide production by AA while aspirin or nimesulide, two cyclooxygenase inhibitors, had a smaller attenuating effect.

In vivo, the diets did not change the blood pressure compared to control animals but aortic superoxide anion production and the plasmatic 12-HETE concentration, a metabolite of 12-lipoxygenase, were both increased in the AA-treated animals and prevented by the combined therapy with DHA. The Ω -6/ Ω -3 ratio is likely an important factor in the production of oxidative stress in the vasculature.

Key words: aorta, superoxide anion, fatty acid, omega-6, omega-3, blood pressure, Sprague-Dawley rats, smooth muscles cells.

Introduction

Omega-3 and omega-6 (Ω -3 and Ω -6) are fatty acids (FA) commonly found in oils extracted from vegetable sources and are an important part of the mammalian diet. The preventive effects of a high Ω -3 FA uptake on cardiovascular diseases were originally highlighted in studies carried out in the Inuit population from Greenland [1]. Since then, the interest in Ω -3 FA was considerably enhanced because their use was viewed as a cheap and efficient way to prevent or attenuate cardiovascular events.

Although, the benefits of a diet rich in unsaturated FA compared to saturated FA to prevent vascular diseases are well proven [2], Ω -3 FA appear to have additional beneficial effects on cardiovascular events unrelated to the lipid profile (HDL/LDL) or blood pressure of patients as demonstrated by the Lyon Diet Heart trial [3]. One proposed hypothesis to explain the beneficial influence of Ω -3 FA is related to their capacity to compete with arachidonic acid (AA) and to slow the enzymatic reactions involved in prostanoid and leukotriene synthesis [4,5]. A decrease of platelet aggregation by eicosapentaenoic acid (EPA) through a reduction of the synthesis of type-2 prostanoids or type-4 leukotrienes by cyclooxygenases or lipoxygenases was demonstrated [6-8]. This inhibitory effect can be either caused by the conformation of Ω -3 FA molecule slowing down the reaction at the catalytic site [9] or by the 'alternate' products such as type-3 prostanoids that can be generated when Ω -3 FA are used as substrates [10]. An Ω -3 enriched diet has also been shown to cause a reduction of

interleukins production by immune cells [11-13] and a reduction of growth factors [14] and cellular adhesion factors (I-CAM, V-CAM) involved in atherosclerosis [15,16].

In contrast to what was observed for Ω -3 FA, Ω -6 FA were reported to favor the formation of pro-inflammatory products [17]. The most important source of AA in tissues comes from dietary linoleic acid (LA) a common FA in most vegetable oils [18]. Consequently to those observations, it was hypothesized that the balance between dietary Ω -6 and Ω -3 FA would be crucial to determine the benefit of unsaturated FA for prevention of cardiovascular diseases. A high Ω -6/ Ω -3 ratio would favor pro-inflammatory pathways and be detrimental in the development of atherosclerosis. The Physician Health Study suggested that a low Ω -3 concentration in the blood is inversely proportional to cardiovascular events and could be considered as a risk factor [19]. Moreover, anti-atherogenic properties of a diet with a low ratio Ω -6/ Ω -3 were demonstrated in a knock-out mouse model for LDL receptors when compared with a diet with a high ratio Ω -6/ Ω -3 after 16 weeks [20].

In vitro studies have shown that LA (Ω -6) can increase free radical production in macrophages or vascular endothelial cells [21]. Moreover, it was reported that the inhibition of lipoxygenases in those cultures could prevent the oxidation of LDL suggesting a role of this pathway in the oxidant effects of LA [22,23]. Also, many cytochrome p450 (CYP450) isoforms, using AA as a substrate, were identified as an important source of superoxide anion in the vasculature, particularly in response to reperfusion following ischemia [24]. We have shown that one of the most important

enzyme involved in vascular superoxide production, the NAD(P)H oxidase, was involved in the increased production of superoxide anion in vascular smooth muscle cells and aorta from rats treated with angiotensin II or glucose and was associated with an increased systolic blood pressure [25,26]. Since superoxide production is an important mediator of endothelial dysfunction and vascular disease [27], the oxidative effects of dietary Ω -6 FA potentially play a major role in the emergence of cardiovascular diseases.

The objective in the present study was to evaluate the capacity of Ω -3 and Ω -6 FA to produce superoxide anion in vascular smooth muscle cells and whether AA dependent pathways, such as cyclooxygenases, lipoxygenases and cytochrome p450 monooxygenases are involved in this production. Moreover, the effects of a depletion of Ω -3 FAs on the production of aortic superoxide anion as well as on blood pressure levels were investigated.

Material and methods

Cell culture

Untreated Sprague-Dawley rats weighing 250g were sacrificed under light anaesthesia with CO₂ and the aorta was transferred to sterile dishes containing culture medium. Aortic vascular smooth muscle cells were isolated from male Sprague-Dawley rats (225-250 g) by enzymatic digestion of aorta with collagenase and elastase (Sigma Chemical Co., St-Louis) as previously described [28]. Cells were grown in DMEM with

5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin-streptomycin) (Invitrogen Canada Inc, Ontario) in a controlled environment at 37°C and 5% CO₂.

Cells were exposed for 48 hours to AA 50 µMol/L combined with different inhibitors (see table 1). Products were purchased from Sigma Chemical Co., St-Louis.

Superoxide anion production was measured with the lucigenin method using low concentrations (5 µMol/L) described previously [29,30] and adapted to cell cultures. Briefly, cells were suspended with trypsin 0.05 % (Invitrogen Canada Inc, Ontario) and washed in oxygenated Krebs-Hepes buffer after centrifugation. Cells were counted with a cytometer and approximately 10⁶ cells were placed in 2 ml Krebs-Hepes buffer in scintillation vials containing a lucigenin (5 µMol/L) solution and the emitted luminescence was measured with a Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer, St-Laurent) as previously described [31]. The luminescence level was measured as described for the aorta. The average luminescence value was estimated, the background value was subtracted and the results were adjusted according to the protein content (mg) of the samples. Moreover, the activation of NAD(P)H oxidase activity in the samples was assessed by adding NAD(P)H 10⁻⁴ Mol/L (Sigma Chemical Co.) in the vials before counting. Basal superoxide-induced luminescence was then subtracted from the luminescence value induced by NAD(P)H.

Animals

Male Sprague-Dawley rats weighing around 250g were used (Charles River Canada, St-Constant, Qc). The animals were divided in 5 groups: A control group fed with Charles River Rodent Diet no. 5075 with 4.5% (mass) fat and left untreated. Four treated groups were fed with AIN-76 diet (Testdiet/Ren's Feed, Oakville, Ontario) combined with different oils administered daily by gavage. The Canola-Coco group was given 3g/kg (animal weight) canola oil and 1g/kg coconut oil, the ARA-Coco group was given 3g/kg ARASCO® (an oil with ~40% arachidonic acid) (Martek Biosciences Corporation, Columbia, MD) and 1g/kg coconut oil, the Canola-DHA group was given 3g/kg canola oil and 1g/kg DHASCO® (an oil with ~40% docosahexaenoic acid) (Martek Bioscience, Columbia, MD) and the ARA-DHA group was given 3g/kg ARASCO® and 1g/kg DHASCO®. The total amount of fat in the diet of treated animals was approximately 10% (weight). Table 2 shows additional details on the fatty acids administered to each group. Treatments lasted for 6 weeks and each group contained at least 8 animals.

The systolic blood pressure of the rats was monitored each week by tail cuff photoplethysmography. At the end of the treatments, systolic, diastolic and heart rate were measured by inserting a short PE-50 catheter into the left femoral artery up to the distal abdominal aorta under anesthesia by isoflurane. The catheter was then connected to a pressure transducer. Plasma adrenaline and noradrenaline levels were measured in blood samples collected from resting animals through the femoral catheter 24 hours after

the surgery. Catecholamines were assayed by high-performance liquid chromatography using a modification of the method of Remie and Zaagsma as described by Hjemdahl [32,33]. 12-HETE was measured with an enzyme immunoassay kit (Assay Designs, Ann Arbor, USA, Cat.# 900-050).

Superoxide anion production was measured with the lucigenin method described above. Briefly the aorta was cleaned in Kreb-Hepes buffer and approximately 5mg of tissue were placed in 2 ml Kreb-Hepes buffer in scintillation vials containing a lucigenin (5 μ Mol/L) solution (Sigma Chemical Co., St-Louis). The average luminescence value was estimated, the background value was subtracted and the result was divided by the wet weight (mg) of the samples.

All investigations were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and monitored by an institutional care committee.

Statistical analysis

Values are expressed as the mean \pm SD. The data were analysed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni or Newman-Keuls (for fig. 2) post-test with the program GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software Inc.). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Superoxide anion measurements in vascular smooth muscle cells

Vascular smooth muscle cells are an important source of superoxide anion in the aorta and to determine how the concentration of circulating Ω -3 or Ω -6 FA can modulate superoxide production in those cells we have evaluated the pro-oxidant effect of different concentrations of Ω -3 or Ω -6 FA in the culture medium. The superoxide anion production was increased by 61% ($p < 0.001$) following a treatment with the Ω -6 arachidonic acid (AA) compared with control values (9397 ± 1999 vs 5836 ± 591 cpm/mg proteins). This increase was markedly attenuated ($p < 0.01$) by a combined treatment with the Ω -3 FA eicosapentaenoic acid (EPA) (7322 ± 1424 cpm/mg proteins) or the Ω -3 FA docosahexaenoic acid (DHA) (7310 ± 970 cpm/mg proteins). EPA or DHA alone did not significantly increase superoxide anion production (6818 ± 2226 and 6406 ± 727 cpm/mg proteins) (fig. 1a). The arachidonic acid increase of superoxide anion production was prevented dose-dependently by DHA confirming that the balance of Ω -6/ Ω -3 in the cellular environment is a determining factor in the oxidative response of vascular smooth muscle cells (fig. 1b).

To identify the possible sources of superoxide anion production induced by Ω -6 FA in vascular smooth muscle cells, the cells were treated with a combination of AA and inhibitors of pathways known for their roles in the conversion of FA into signaling molecules (fig. 2). The combination of AA with inhibitors of the cyclooxygenase (COX)

pathways, aspirin (asa) for COX1 or nimesulide (nim) for COX2 attenuated slightly but not significantly superoxide production while the inhibition of 5,15-lipoxygenase (LOX) by NDGA did not prevent the superoxide anion production by AA significantly. In contrast, the non-selective inhibition of LOX by caffeic acid and the specific inhibition of 12-LOX by baicalein totally prevented the increase of superoxide anion following AA stimulation in those cells (6199 ± 1474 and 6818 ± 1473 cpm/mg proteins respectively) ($p < 0.001$). Moreover, sulfaphenazole, an inhibitor of cytochromes p450 2C, as well as lipoic acid, an antioxidant, also prevented AA-induced superoxide anion production (7094 ± 2646 and 6836 ± 1649 cpm/mg proteins respectively) ($p < 0.01$). All the inhibitors used alone had little or no effect on the basal superoxide anion production (data not shown). According to these results, Ω -6 FA exert their oxidative effects mainly through the activation of 12-LOX and possibly through some isoforms of the cytochrome p450 superfamily.

NAD(P)H oxidase is considered as one of the most important source of vascular superoxide anion involved in vascular disease. Therefore, the involvement of NAD(P)H oxidase in the oxidative effect of AA was investigated. Stimulation with angiotensin II increased the superoxide anion production in cultured vascular smooth muscle cells as previously reported and this effect was cumulative to the superoxide generation by AA in cells treated with both angiotensin II and AA (8865 ± 1066 and 12498 ± 3877 cpm/mg proteins respectively) ($p < 0.001$) (fig. 3a). Apocynin, an NAD(P)H oxidase inhibitor had no effect on the superoxide anion production induced by AA. Similarly, EPA had no effect on the Angiotensin II-induced superoxide anion production. NAD(P)H oxidase

activity in the cultured cells was increased in response to angiotensin II but not modified in cells treated with AA or EPA ($p < 0.001$) (fig. 3b). Therefore, the superoxide anion production triggered by AA is completely independent to the mechanisms associated with angiotensin II and both stimuli have a cumulative effect on superoxide anion production.

Animal experiments

The hemodynamic and oxidative properties of a chronic treatment with Ω -6 FA *in vivo* needed to be explored. To evaluate this, four groups of rats were fed with diets containing different ratio of Ω -6/ Ω -3 (table 2). Systolic or diastolic blood pressure measurements did not vary significantly when measured either by tail-cuff during the treatments (data not shown) or by a catheter inserted into the femoral artery after 6 weeks of chronic therapy (fig. 4a). Decreases in heart rates were observed between controls and ARA-Coco, Canola-DHA and ARA-DHA groups (366 ± 6 vs 333 ± 29 , 303 ± 10 , 319 ± 9 BPM respectively) ($p < 0.01$) (fig. 4b). This bradycardic effect was not associated with a significant change in plasma adrenaline or noradrenaline levels (Table 3). Body weight of animals in control or treated groups did not differ significantly (data not shown).

Superoxide anion production was significantly increased only in the aorta of ARA-Coco (2187 ± 907 , $p < 0.05$) group compared with controls (1129 ± 225 CPM/mg tissue). In the other groups, superoxide anion production values were not significantly different than those found in control tissues (fig. 5a). NAD(P)H oxidase activities in the aorta did not differ following *in vivo* dietary treatments (fig. 5b). 12-HETE, a metabolite of 12-

lipooxygenase, was significantly increased in the plasma of ARA-Coco (15028 ± 6261 , $p < 0.05$) group compared with controls (3405 ± 2331 pg/ml). This increase was prevented in the ARA-DHA group (4073 ± 3248 , $p < 0.05$) (fig. 6). It thus appears that the chronic dietary treatment with Ω -6 FA exerts an oxidative effect in the aorta in living animals and can also increase the circulating levels of 12-HETE.

Discussion

The objective of this study was to study and characterize the oxidative effects of Ω -3 and Ω -6 FA in smooth muscle cells both *in vivo* and *in vitro* and also to evaluate whether a depletion of Ω -3 combined with an increase of Ω -6 FA at the vascular level would induce changes in blood pressure and superoxide production.

AA induced a significant superoxide anion increase in vascular smooth muscle cells. EPA and DHA, two Ω -3 FA, prevented the increased production of superoxide anion by AA (fig. 1a). This preventive effect was evaluated with different concentrations of DHA on the AA-generated superoxide anion production and a dose-dependent effect up to 50 μ M of DHA was observed (fig. 1b). Since EPA or DHA used alone did not appear to have any inherent antioxidant properties, the most likely explanation for the observed 'antioxidant' effect of EPA and DHA may be mediated through an interference with AA-driven pathways by a competitive mechanism as previously suggested [4,6]. Previous studies also pointed out that Ω -3 FA are not free radicals scavengers or direct antioxidants. In a study carried out in macrophages of guinea pigs, it was previously

shown that unsaturated Ω -3, Ω -6 and n-9 FA had oxidant properties whereas saturated FA had no effect [34]. Moreover, high doses of Ω -3 FA (250mg/kg/day) even increased lipid peroxidation in rats [35].

Inhibition of COX1 and 2 by aspirin and nimesulide respectively only had a partial but not significant inhibitory effect on AA stimulation of superoxide anion production (fig. 2). This observation is somewhat unexpected considering our previous work suggesting that COX2 is a major source of superoxide anion in VSMC and the fact that AA is the main substrate for this enzyme [36]. However, a study has shown that COX2 activity is more dependent on the expression of the enzyme itself rather than on the substrate availability [37], thus suggesting that most of the increased superoxide anion production following an excess in AA is likely to originate from another source. Lipoxygenases (LOX) appear to be involved in this increased production since caffeic acid, an unselective LOX inhibitor, prevented this increase. Although, NDGA, a 5 and 15-LOX inhibitor, had no effect while baicalein, a 12-LOX inhibitor, in contrast prevented totally the increased superoxide anion production suggesting that 12-LOX is the main enzyme responsible for this increase. 12-LOX produces (12)-Hydroxyeicosatrianoic acid (12-HETE) by the hydroperoxydation of arachidonic acid into (12)-Hydroperoxyeicosatrianoic acid (12-HPETE). 12-HETE was previously associated with increased superoxide anion production in platelets [38]. Moreover, the overexpression of 12 and 15-LOX was also associated with the increased formation of atherosclerotic lesions in a model of LDL receptor deficient mouse [39,40]. Inhibition of cytochromes p450 2C by sulfaphenazole also had a preventive effect on superoxide

production although smaller. Such a pattern involving jointly LOX and cytochrome p450 as major contributors to free radicals production by stimulation with AA was also observed previously in cultured cortical neurons [41].

Free radical generation induced by an endogenous stimulation of the release of arachidonic acid following a treatment with angiotensin II in vascular smooth muscle cells was previously reported and a NAD(P)H oxidase-dependent mechanism was postulated to explain this effect [42]. Indeed, it is widely accepted that NAD(P)H oxidase is one of the main mechanism by which angiotensin II produce free radicals. However, our results do not support a relationship between the pathways responsible for superoxide production by angiotensin II or by arachidonic acid. Since apocynin, an NAD(P)H oxidase inhibitor, did not prevent the superoxide anion generation by AA, this indicated that NAD(P)H oxidase is not involved in the oxidative action of Ω -6 FA. An additive effect was observed in response to the combination of AA and angiotensin II thus suggesting that an overactivation of the renin-angiotensin system and an abnormal Ω -6/ Ω -3 ratio in the diet might constitute two independent factors promoting vascular free radical generation. Since EPA could not diminish angiotensin II-induced superoxide anion production, this strengthened the hypothesis that the antioxidant properties of Ω -3 FA are only the result of a direct interference with AA metabolism (fig. 3a). Moreover, NAD(P)H oxidase activity was not activated in FA-treated cultured cells in contrast to the increase induced by angiotensin II (fig. 3b).

Although, high doses of Ω -3 in humans have been reported to have slight hypotensive effects [43,44], no difference in blood pressure were observed amongst the different groups of rats subjected to various FA diets (fig. 4a) but this absence of pressure effect could be due to a too short period of therapy over only 6 weeks. However, heart rate was lowered in AA or DHA treated rats (fig. 4b). This observation is coherent with the studies of McLennan group who showed that a diet rich in Ω -3 and to a lesser degree Ω -6 FAs reduced the duration of arrhythmia in isolated Wistar rat hearts [45,46]. This bradycardic effect was not associated with a change in sympathetic activity since plasma catecholamines were not different between the groups (Table 3). It was hypothesized that this antiarrhythmic effect was caused by an action of FA on calcium and sodium currents by the eicosanoids derived from Ω -3 or Ω -6 [47].

Regarding the production of superoxide anion in the aortas, only ARA-Coco group demonstrated a significant increase, thus confirming the findings in cultured vascular smooth muscle cells (fig. 5a). NAD(P)H oxidase was apparently not involved in this production since a stimulation of the tissues from each group by NAD(P)H did not yield different results (fig.5b). Despite this increase of vascular superoxide anion production, the ARA-Coco group had a normal systolic and diastolic blood pressure after 6 weeks of treatment. It should be reminded that a diet rich in unsaturated fatty acid diet, including Ω -6 FA, may have other beneficial effects through the reduction of low density lipoproteins (LDL) [2]. It is therefore likely that the detrimental effect of having a higher superoxide anion output at the vascular level might have been compensated by a decrease in circulating LDL. Moreover, our findings are in agreement with most animal or human

studies regarding the fact that Ω -3 and 6 FA diets had little impact on blood pressure levels. However, this Ω -6 FA-stimulated vascular superoxide production could still be detrimental for vascular health, particularly in combination with other sources of superoxide anion in the vasculature as we have demonstrated in isolated smooth muscles cells. We also have evidence that the arachidonic acid diet can increase the production of circulating 12-HETE (fig. 6), an important metabolite of 12-lipoxygenase. Since inhibitors of 12-lipoxygenase prevented successfully superoxide production in vascular smooth muscle cells, the production of 12-HETE can possibly be involved in the oxidative effects of Ω -6 and the preventive effects of Ω -3 FA.

Despite a lack of short-term effect on blood pressure, a diet rich in Ω -6 and poor in Ω -3 increases significantly the production of superoxide anion in the aorta of Sprague-Dawley rats. Moreover, this oxidative effect appears to be mostly dependent on 12-LOX activity and on at least one isoenzyme in the cytochrome p450 family. Thus, the ratio of Ω -6/ Ω -3 in the diet could have a significant long term impact on the cardiovascular system. It appears that the adjustment in the balance of those FAs in the diet could attenuate the deleterious effects of Ω -6 thus supporting the hypothesis that dietary interventions could constitute an efficacious approach for the treatment or prevention of cardiovascular diseases.

Acknowledgements

The authors are grateful to Louise Grondin and Pierre Moreau for their kind assistance in the intra arterial measurement of blood pressure and to Diane Papin for her expert technical support.

We are also thankful to Martek Biosciences Corporation for providing the ARASCO® and DHASCO® oils.

References

- [1] Bang, H. O.; Dyerberg, J.; Nielsen, A. B. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet* 1:1143-1145; 1971.
- [2] Mattson, F. H.; Grundy, S. M. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lipid Res.* 26:194-202; 1985.
- [3] de Lorgeril, M.; Salen, P.; Martin, J. L.; Monjaud, I.; Delaye, J.; Mamelle, N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99:779-785; 1999.
- [4] Weber, P. C. The modification of the arachidonic acid cascade by n-3 fatty acids. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 20:232-240; 1990.
- [5] Obata, T.; Nagakura, T.; Masaki, T.; Maekawa, K.; Yamashita, K. Eicosapentaenoic acid inhibits prostaglandin D2 generation by inhibiting cyclooxygenase-2 in cultured human mast cells. *Clin. Exp. Allergy* 29:1129-1135; 1999.
- [6] Needleman, P.; Whitaker, M. O.; Wyche, A.; Watters, K.; Sprecher, H.; Raz, A. Manipulation of platelet aggregation by prostaglandins and their fatty acid precursors: pharmacological basis for a therapeutic approach. *Prostaglandins* 19:165-181; 1980.
- [7] Agren, J. J.; Vaisanen, S.; Hanninen, O.; Muller, A. D.; Hornstra, G. Hemostatic factors and platelet aggregation after a fish-enriched diet or fish oil or docosahexaenoic acid supplementation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 57:419-421; 1997.

- [8] Mori, T. A.; Beilin, L. J.; Burke, V.; Morris, J.; Ritchie, J. Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**:279-286; 1997.
- [9] Malkowski, M. G.; Thuresson, E. D.; Lakkides, K. M.; Rieke, C. J.; Micielli, R.; Smith, W. L.; Garavito, R. M. Structure of eicosapentaenoic and linoleic acids in the cyclooxygenase site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J Biol. Chem.* **276**:37547-37555; 2001.
- [10] Dyerberg, J.; Jorgensen, K. A. The effect of arachidonic- and eicosapentaenoic acid on the synthesis of prostacyclin-like material in human umbilical vasculature. *Artery* **8**:12-17; 1980.
- [11] Endres, S.; Ghorbani, R.; Kelley, V. E.; Georgilis, K.; Lonnemann, G.; van der Meer, J. W.; Cannon, J. G.; Rogers, T. S.; Klempner, M. S.; Weber, P. C.; . The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N. Engl. J Med* **320**:265-271; 1989.
- [12] Endres, S.; Meydani, S. N.; Ghorbani, R.; Schindler, R.; Dinarello, C. A. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J Leukoc. Biol.* **54**:599-603; 1993.
- [13] Endres, S.; Eisenhut, T.; Sinha, B. n-3 polyunsaturated fatty acids in the regulation of human cytokine synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **23**:277-281; 1995.
- [14] Fox, P. L.; DiCorleto, P. E. Fish oils inhibit endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein. *Science* **241**:453-456; 1988.
- [15] De, C. R.; Liao, J. K.; Libby, P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am. J Clin. Nutr.* **71**:213S-223S; 2000.
- [16] De, C. R.; Madonna, R.; Massaro, M. Effects of omega-3 fatty acids on cytokines and adhesion molecules. *Curr. Atheroscler. Rep.* **6**:485-491; 2004.
- [17] Heller, A.; Koch, T.; Schmeck, J.; van, A. K. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs* **55**:487-496; 1998.
- [18] Zhou, L.; Nilsson, A. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J Lipid Res.* **42**:1521-1542; 2001.
- [19] Albert, C. M.; Hennekens, C. H.; O'Donnell, C. J.; Ajani, U. A.; Carey, V. J.; Willett, W. C.; Ruskin, J. N.; Manson, J. E. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA* **279**:23-28; 1998.
- [20] Yamashita, T.; Oda, E.; Sano, T.; Yamashita, T.; Ijiru, Y.; Giddings, J. C.; Yamamoto, J. Varying the ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid alters

the tendency to thrombosis and progress of atherosclerosis in apoE^{-/-} LDLR^{-/-} double knockout mouse. *Thromb. Res.* **116**:393-401; 2005.

- [21] Mertens, A.; Holvoet, P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J.* **15**:2073-2084; 2001.
- [22] Parthasarathy, S.; Wieland, E.; Steinberg, D. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:1046-1050; 1989.
- [23] McNally, A. K.; Chisolm, G. M., III; Morel, D. W.; Cathcart, M. K. Activated human monocytes oxidize low-density lipoprotein by a lipoxygenase-dependent pathway. *J. Immunol.* **145**:254-259; 1990.
- [24] Gottlieb, R. A. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. *Arch Biochem. Biophys.* **420**:262-267; 2003.
- [25] Laplante, M. A.; Wu, R.; El Midaoui, A.; de Champlain, J. NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* **21**:927-936; 2003.
- [26] El Midaoui A.; Wu, R.; de Champlain J. Prevention of hypertension, hyperglycemia and vascular oxidative stress by aspirin treatment in chronically glucose-fed rats. *J Hypertens.* **20**:1407-1412; 2002.
- [27] Gryglewski, R. J.; Palmer, R. M.; Moncada, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* **320**:454-456; 1986.
- [28] Wu, L.; de, C. J. Inhibition by cyclic AMP of basal and induced inositol phosphate production in cultured aortic smooth muscle cells from Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* **14**:593-599; 1996.
- [29] Munzel, T.; Sayegh, H.; Freeman, B. A.; Tarpey, M. M.; Harrison, D. G. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* **95**:187-194; 1995.
- [30] Ohara, Y.; Peterson, T. E.; Harrison, D. G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest* **91**:2546-2551; 1993.
- [31] Zalba, G.; Beaumont, F. J.; San, J. G.; Fortuno, A.; Fortuno, M. A.; Etayo, J. C.; Diez, J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **35**:1055-1061; 2000.
- [32] Hjemdahl, P. Plasma catecholamines as markers for sympatho-adrenal activity in human primary hypertension. *Pharmacol. Toxicol.* **63** Suppl 1:27-31; 1988.

- [33] de Champlain J.; Karas, M.; Nguyen, P.; Cartier, P.; Wistaff, R.; Toal, C. B.; Nadeau, R.; Larochelle, P. Different effects of nifedipine and amlodipine on circulating catecholamine levels in essential hypertensive patients. *J Hypertens.* **16**:1357-1369; 1998.
- [34] Bromberg, Y.; Pick, E. Unsaturated fatty acids as second messengers of superoxide generation by macrophages. *Cell Immunol.* **79**:240-252; 1983.
- [35] Vaagenes, H.; Muna, Z. A.; Madsen, L.; Berge, R. K. Low doses of eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and hypolipidemic eicosapentaenoic acid derivatives have no effect on lipid peroxidation in plasma. *Lipids* **33**:1131-1137; 1998.
- [36] Wu, R.; Laplante, M. A.; de Champlain, J. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* **45**:1139-1144; 2005.
- [37] Johnson, C. A.; Balboa, M. A.; Balsinde, J.; Dennis, E. A. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidate phosphohydrolase in human amnionic WISH cells. *J Biol. Chem.* **274**:27689-27693; 1999.
- [38] Jahn, B.; Hansch, G. M. Oxygen radical generation in human platelets: dependence on 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle. *Int. Arch Allergy Appl. Immunol.* **93**:73-79; 1990.
- [39] Harats, D.; Shaish, A.; George, J.; Mulkins, M.; Kurihara, H.; Levkovitz, H.; Sigal, E. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**:2100-2105; 2000.
- [40] Reilly, K. B.; Srinivasan, S.; Hatley, M. E.; Patricia, M. K.; Lannigan, J.; Bolick, D. T.; Vandenhoff, G.; Pei, H.; Natarajan, R.; Nadler, J. L.; Hedrick, C. C. 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. *J Biol. Chem.* **279**:9440-9450; 2004.
- [41] Kwon, K. J.; Jung, Y. S.; Lee, S. H.; Moon, C. H.; Baik, E. J. Arachidonic acid induces neuronal death through lipoxygenase and cytochrome P450 rather than cyclooxygenase. *J Neurosci. Res.* **81**:73-84; 2005.
- [42] Zafari, A. M.; Ushio-Fukai, M.; Minieri, C. A.; Akers, M.; Lassegue, B.; Griendling, K. K. Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxid. Redox. Signal.* **1**:167-179; 1999.
- [43] Howe, P. R. Dietary fats and hypertension. Focus on fish oil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **827**:339-352; 1997.

- [44] Morris, M. C.; Sacks, F.; Rosner, B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* **88**:523-533; 1993.
- [45] McLennan, P. L.; Abeywardena, M. Y.; Charnock, J. S. Influence of dietary lipids on arrhythmias and infarction after coronary artery ligation in rats. *Can. J Physiol Pharmacol.* **63**:1411-1417; 1985.
- [46] McLennan, P. L.; Abeywardena, M. Y.; Charnock, J. S. Reversal of the arrhythmogenic effects of long-term saturated fatty acid intake by dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Am. J Clin. Nutr.* **51**:53-58; 1990.
- [47] Kang, J. X.; Leaf, A. Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am. J Clin. Nutr.* **71**:202S-207S; 2000.

Legend

Figure 1a) Superoxide anion production in cultured vascular smooth muscle cells treated with different FAs. Treatment were performed with 50 $\mu\text{Mol/L}$ of FAs for 48 hours. **1b)** Dose-response effect of varying concentrations of DHA on the superoxide anion production triggered by arachidonic acid 50 $\mu\text{Mol/L}$. Measurements were performed with a method based on the luminescence of lucigenin. Symbols: AA=arachidonic acid, LA=linoleic acid, EPA=eicosapentaenoic acid, DHA=docosahexaenoic acid. * $p<0.001$ vs Controls, $\Delta p<0.01$ vs AA. Data is presented as mean \pm SD, $n=8$ (fig.1a), $n=4$ (fig.1b).

Figure 2) Superoxide anion production in cultured vascular smooth muscle cells produced in response to arachidonic acid combined with different inhibitors of arachidonic acid pathways. Measurements were performed with a method based on the luminescence of lucigenin. Symbols: AA=arachidonic acid, asa=aspirin, nim=nimesulide, caf=caffeic acid, ndga= nordihydroguaiaretic acid, bai=baicalein, sulf=sulfaphenazole, lipoic=lipoic acid, Ang = Angiotensin II. * $p<0.01$ vs Controls, $\Delta p<0.01$ vs AA. Data is presented as mean \pm SD, $n=8$.

Figure 3a) Differences between the mechanisms stimulated by arachidonic acid and angiotensin II for the increase of superoxide anion production in cultured vascular smooth muscle cells. **3b)** NAD(P)H oxidase activity in the cells treated with AA, EPA and Ang. Measurement were performed by saturating the buffer with NADPH. Symbols: Ang = Angiotensin II, AA=arachidonic acid, apo=apocynine, EPA=eicosapentaenoic acid.

* $p < 0.001$ vs Controls, ** $p < 0.05$ vs Ang, $\Delta p < 0.05$ vs AA. Data is presented as mean \pm SD, $n=6$.

Figure 4a) Effects of different diets of Ω -3 and Ω -6 FAs on the systolic and diastolic blood pressure measured by a force transducer linked to a catheter in the femoral artery of Sprague-Dawley rats. Data is presented as mean \pm SD, $n=4$. **4b)** Effects of different diets of Ω -3 and Ω -6 FAs on heart rates of Sprague-Dawley rats. * $p < 0.01$ vs Controls. Data is presented as mean \pm SD, $n=4$.

Figure 5a) Production of superoxide anion in aortas from rats receiving different diets of Ω -3 and Ω -6 FAs. Measurements were performed with a method based on the luminescence of lucigenin. **5b)** NAD(P)H oxidase activity in the aortae from the different groups. Measurement were performed by saturating the buffer with NADPH * $p < 0.05$ vs controls. Data is presented as mean \pm SD, $n=8$, $n=6$ for controls.

Figure 6) 12-HETE levels in the plasma of rats receiving different diets of Ω -3 and Ω -6 FAs. Measurements were performed with an immunoassay kit based on the activity of an alkaline phosphatase. pg/ml = picograms per milliliter of plasma, 12-HETE = 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid.

* $p < 0.05$ vs Controls; $\Delta p < 0.05$ vs ARA-Coco, Data is presented as mean \pm SD, $n=5$.

Tables

Table 1) Products used for cell treatments

Treatments lasted 48 hours

Products	Symbols	Concentration	Description
Arachidonic acid	AA	50 μ Mol/L	Omega-6
Eicosapentanoic acid	EPA	50 μ Mol/L	Omega-3
Docosahexaenoic acid	DHA	50 μ Mol/L	Omega-3
Acetylsalicylic acid	asa	10 μ Mol/L	Cyclooxygenase 1/2 inhibitor
Nimesulide	nim	10 μ Mol/L	Cyclooxygenase 2 inhibitor
Baicalein	bai	1 μ Mol/L	12-lipoxygenase inhibitor
Caffeic acid	caf	1 μ Mol/L	5,12,15-lipoxygenase inhibitor
Nordihydroguaretic acid	ndga	1 μ Mol/L	5,15-lipoxygenase inhibitor
Sulfaphenazole	sulf	1 μ Mol/L	Cytochrome p450 inhibitor
Apocynin	apo	1 μ Mol/L	NAD(P)H oxidase inhibitor
Lipoic acid	lipoic	10 μ Mol/L	Superoxide anion scavenger
Angiotensin II	Ang	1 μ Mol/L	NAD(P)H oxidase activator

Table 2: Characteristics of the diet of each group

	Control	Canola +coconut	ARA +coconut	Canola +DHA	ARA +DHA
	<i>g/kg/day</i>	<i>g/kg/day</i>	<i>g/kg/day</i>	<i>g/kg/day</i>	<i>g/kg/day</i>
Linoleic Acid (Ω -6)	1.81	3.22	2.53	3.20	2.51
Linolenic acid (Ω -3)	0.13	0.25	0.04	0.25	0.04
Saturated FAs	0.72	1.63	2.17	1.03	1.57
Monounsaturated FAs	0.96	2.65	1.63	2.83	1.27
Arachidonic acid (Ω -6)	0	0	1.26	0	1.26
Docosahexaenoic acid (DHA) (Ω -3)	0	0	0	0.44	0.44
Gamma linolenic Acid (Ω -6)	0	0	0.09	0	0.09
Total Ω -3	0.29	0.25	0.04	0.69	0.48
Total Ω -6	1.81	3.22	2.62	3.20	2.60
Ratio Ω -6/ Ω -3	6.2	12.9	65.5	4.6	5.4
Total amount of chow consumed	84	80	80	80	80
Total amount of fat (% weight)	3.78 (4.5%)	7.75 (9.7%)	7.72 (9.7%)	7.75 (9.7%)	7.20 (9.0%)
Total amount of carbohydrates (% weight)	46.2 (55%)	53 (66%)	53 (66%)	53 (66%)	53 (66%)
Total amount of proteins (% weight)	16.8 (20%)	14.4 (18%)	14.4 (18%)	14.4 (18%)	14.4 (18%)

Table 3: Concentration of adrenaline, noradrenaline and 12-HETE in the blood of in the different groups of rats.

Animals aortae	Adrenaline	Noradrenaline
	pg/ml	pg/ml
Controls (untreated animals)	57 ± 19	125 ± 19
Canola-Coco	49 ± 37	128 ± 51
ARA-Coco	50 ± 23	147 ± 50
Canola-DHA	60 ± 31	140 ± 9
ARA-DHA	46 ± 15	128 ± 18

pg/ml = picogram per milliliter of blood

Figure 1a)

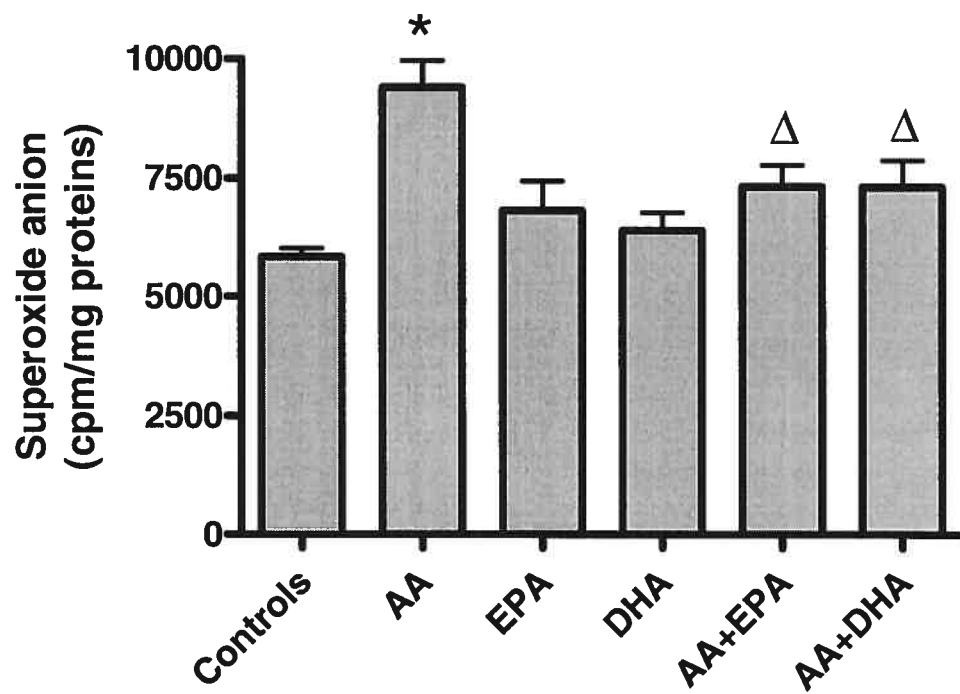


Figure 1b)

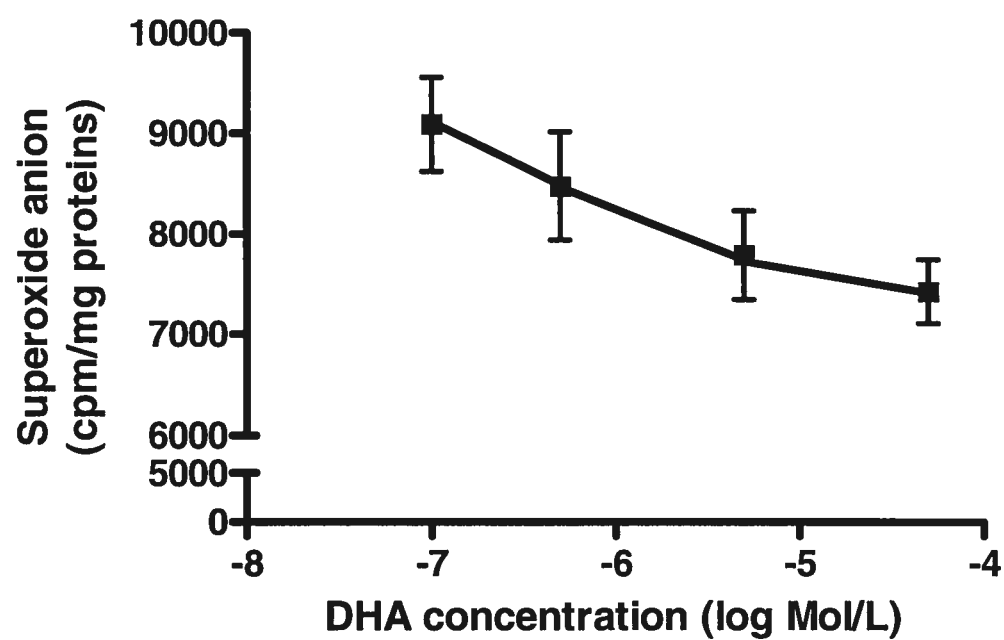


Figure 2)

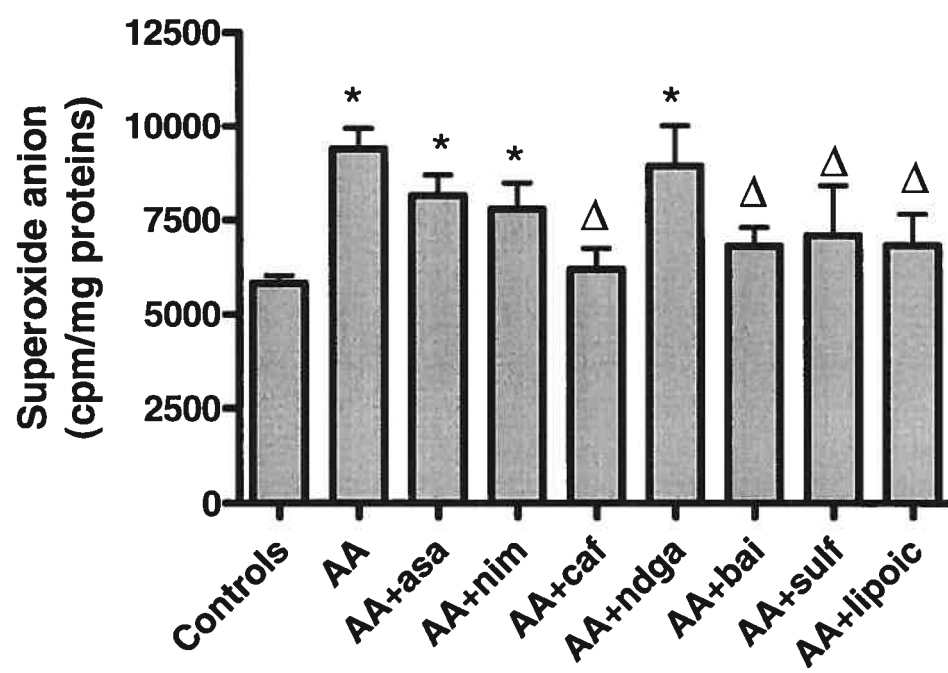


Figure 3a)

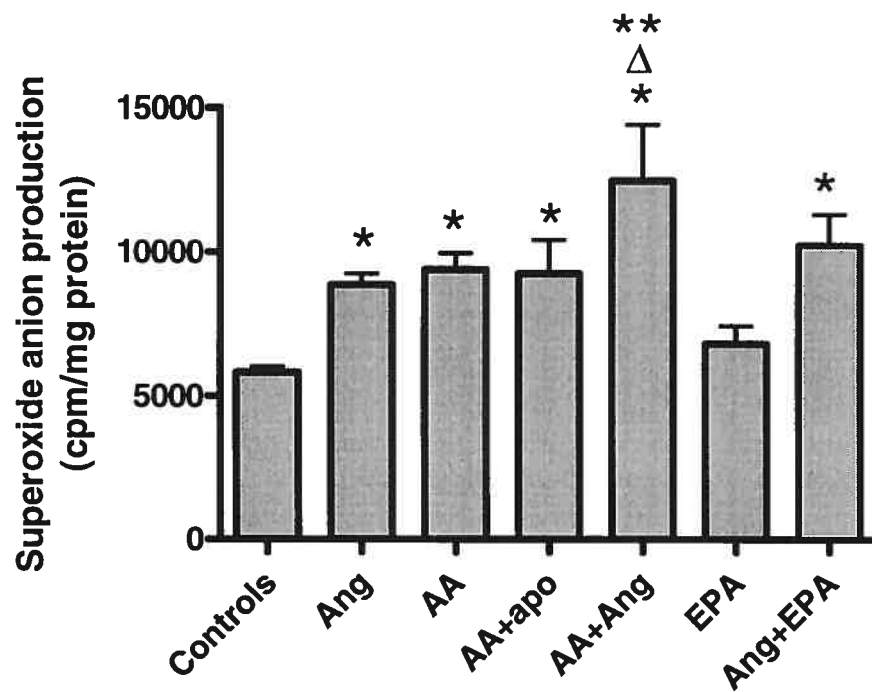


Figure 3b)

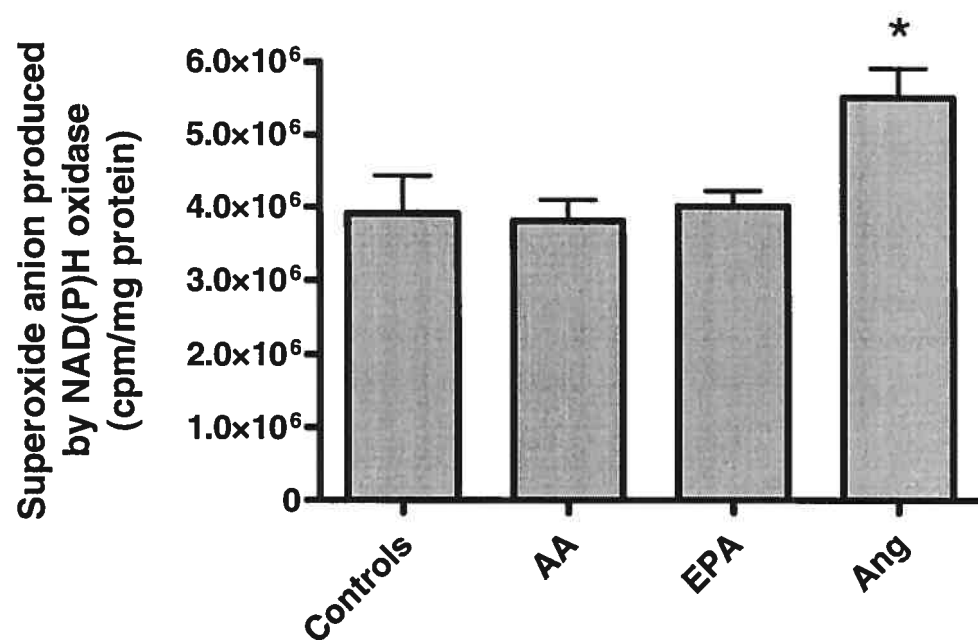


Figure 4a)

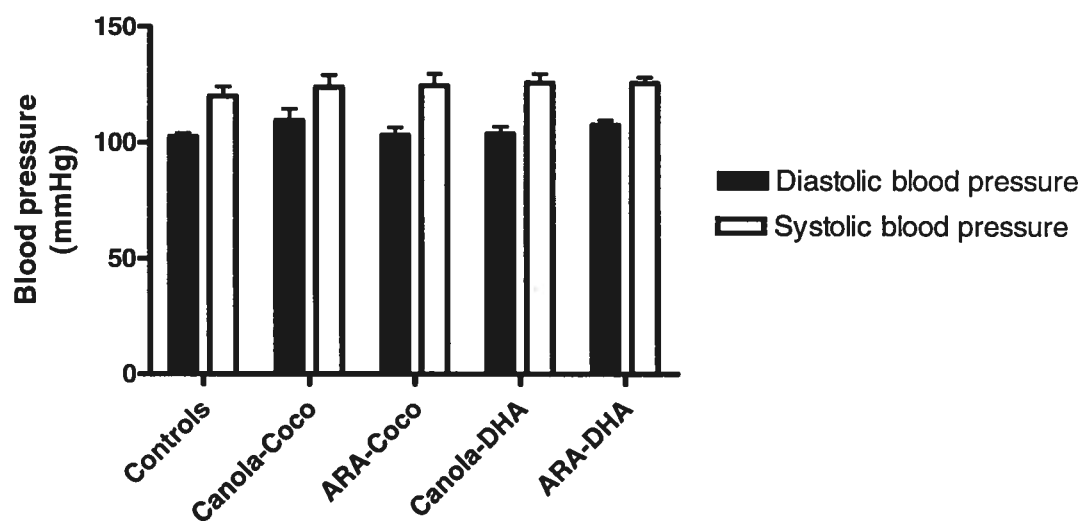


Figure 4b)

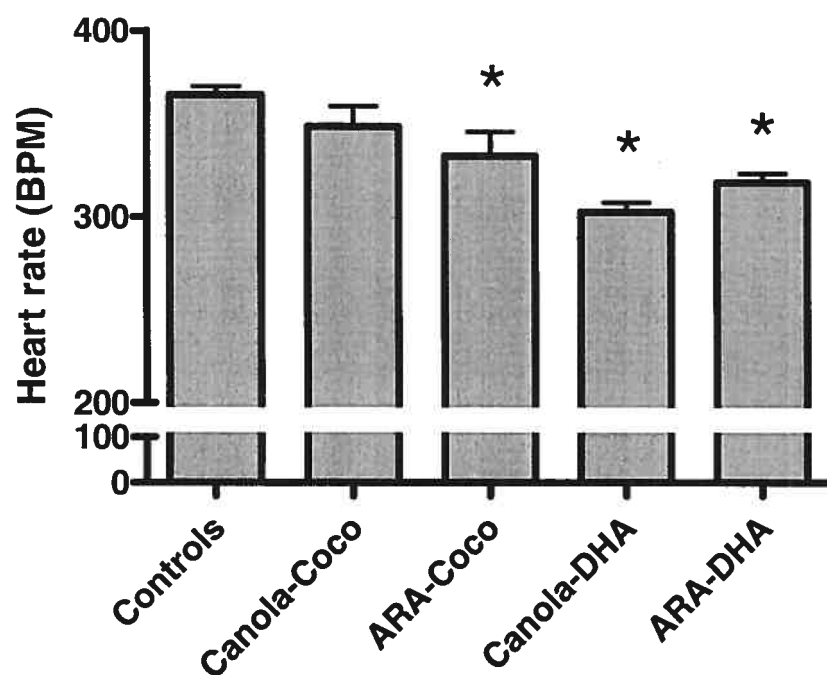


Figure 5a)

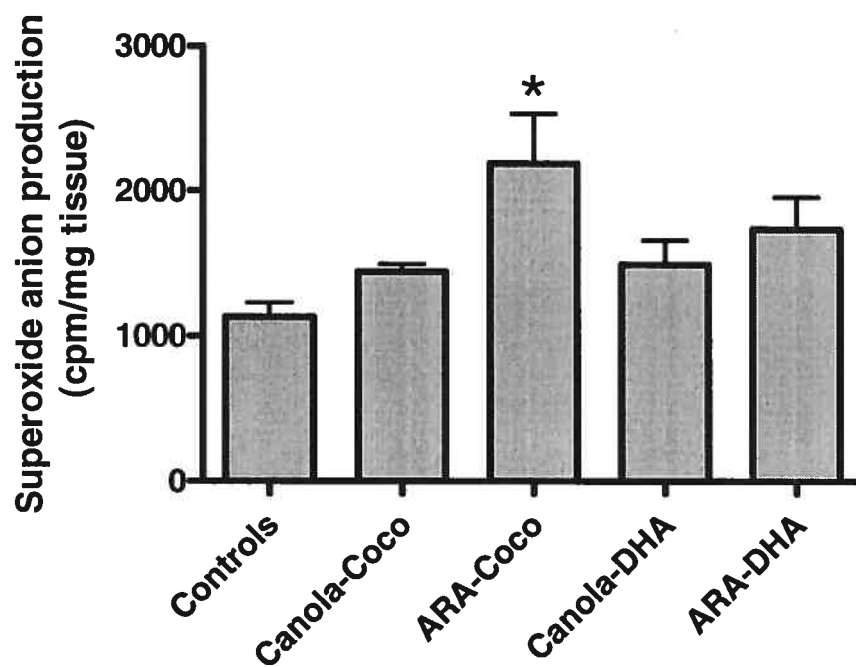


Figure 5b)

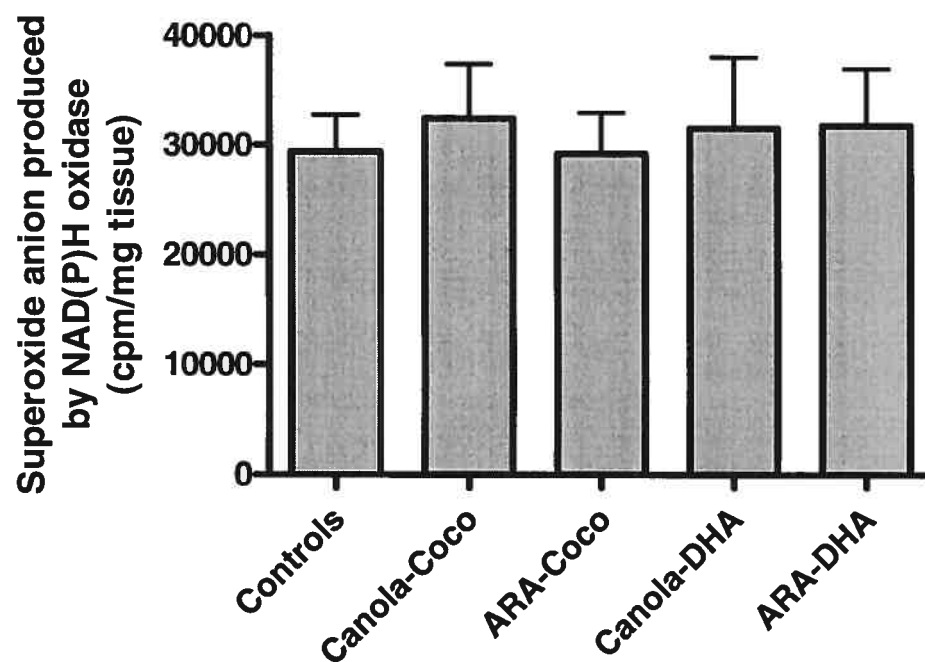
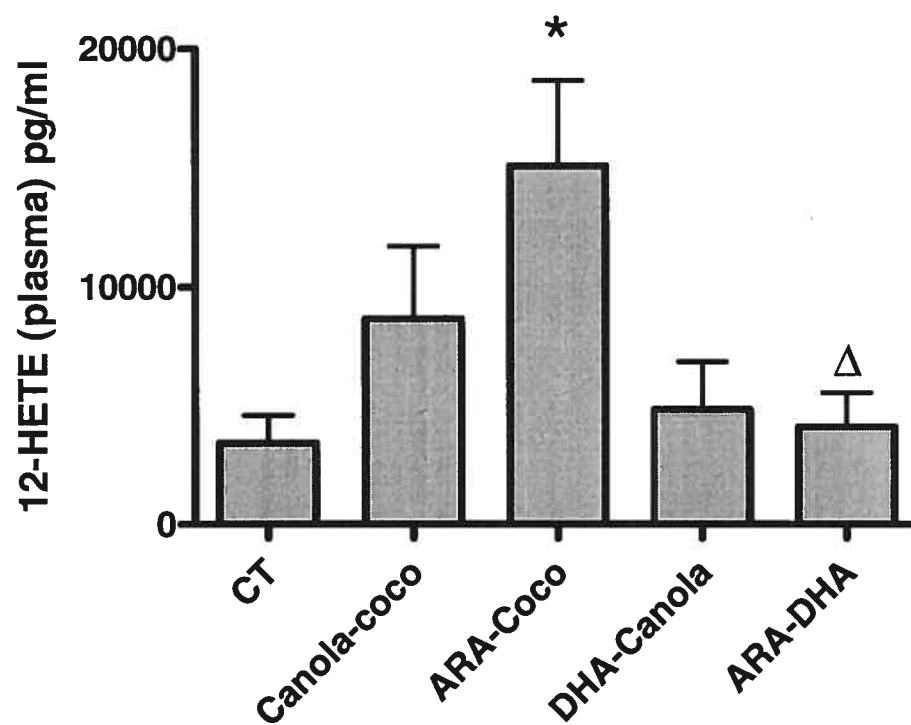


Figure 6)



CHAPITRE VI

Discussion

CHAPITRE VI – DISCUSSION

L'hypertension essentielle est une maladie multi factorielle dans laquelle les effets des multiples éléments déclencheurs sont canalisés principalement par le système nerveux autonome et l'hyperactivation du système nerveux sympathique ou par l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. Ces systèmes sont modulés et affectent l'état du réseau cardiovasculaire en réponse à des causes environnementales, comme l'alimentation, le stress chronique ou le manque d'exercice, le tout greffé sur une base génétique qui amplifie l'impact des facteurs environnementaux. L'augmentation de la résistance périphérique vasculaire et l'augmentation du rythme ou du travail cardiaque suivent et sont responsables de l'augmentation de la pression artérielle. L'hypertension favorise l'apparition de modifications majeures sur le système cardiovasculaire qui contribuent à maintenir et à amplifier la maladie. Le remodelage cardiaque [524] et vasculaire [525] sont par exemple des conséquences bien documentées de l'hypertension.

Au-delà des messagers principaux que sont l'angiotensine et les catécholamines, il existe une série de messagers secondaires qui contrôlent ou déclenchent des changements pathologiques chez les hypertendus. Ces messagers secondaires constituent des cibles potentielles intéressantes pour des approches thérapeutiques, mais surtout sont la clé pour mieux comprendre l'hypertension. Traiter l'hypertension n'est pas une simple question de pharmacopée, les difficultés à traiter adéquatement les populations hypertendues en sont la preuve. Une solution alternative contre ce problème social est une approche préventive qui repose sur une connaissance des mécanismes et des seconds messagers

impliqués dans les maladies cardiovasculaires. Ces connaissances permettent non seulement de raffiner le traitement des malades, mais aussi de recommander des changements spécifiques dans les habitudes de vie qui ont probablement plus d'impact sur la santé des populations en général qu'une approche médicamenteuse.

Nos études sont basées sur la mesure de la production de l'anion superoxyde qui est un second messenger important dans le développement des maladies cardiovasculaires. Nous avons choisi ce radical puisque l'anion superoxyde est la source principale de l'ensemble des radicaux présents dans l'organisme. Notre choix de modèle, un traitement chronique à l'angiotensine II, a été identifié comme un puissant générateur d'anion superoxyde dans les cellules de muscles lisses vasculaires [357]. La capacité de l'anion superoxyde à activer les voies tyrosines kinases [526] et le fait que l'angiotensine II soit aussi un activateur de la croissance cellulaire, soit par une activation directe des récepteurs des facteurs de croissance [120] ou par sa signalisation cellulaire par la protéine kinase C et l'activation des protéines Src [527], suggère la présence d'un mécanisme important de la pathologie vasculaire dans cette relation entre l'angiotensine II, les voies tyrosine kinases et la production de l'anion superoxyde. Des études récentes ont souligné l'association entre les processus de croissance cellulaire mitogéniques et le développement de l'hypertension [528]. Aussi, l'insuline, dont la production est en excès chez le diabétique, active des voies tyrosine kinases et contribue souvent au développement ou à l'amplification des dommages sur le système cardio-vasculaire causés par l'hypertension [529].

Nos études initiales sur le développement de l'hypertension chez le rat traité chroniquement à l'angiotensine II ont permis de découvrir que l'inhibition des voies tyrosines kinases par la génistéine et de la voie ERK-MAPK par le PD98059 pouvaient prévenir l'hypertension (Chapitre 3, figure 5), mais aussi la production d'anion superoxyde (Chapitre 3, figure 1) et l'augmentation de l'activité NAD(P)H oxydase dans les vaisseaux des animaux hypertendus. Ces résultats confirment l'importance de seconds messagers comme la voie ERK-MAPK et la production d'anion superoxyde dans les effets hypertenseurs de l'angiotensine II.

Nous avons démontré que les effets antihypertenseurs de l'inhibition de la voie ERK-MAPK dans un modèle *in vivo* sont reliés à la prévention de la production d'anion superoxyde puisque l'acide α -lipoïque a pu aussi prévenir l'augmentation de la pression chez les animaux traités à l'angiotensine II (Chapitre 3, figure 5). D'autres études ont aussi exploré les effets d'inhibiteurs des voies ERK-MAPK sur les vaisseaux traités à l'angiotensine II. Par exemple, le PD98059 a un effet dilatateur sur les artères de résistances isolées précontractées à l'angiotensine II [171]. Le PD98059 a aussi un effet hypotenseur lorsque administré en aigu à des rats hypertendus à l'angiotensine II [174]. Cependant, nos expériences sont les premières à démontrer l'efficacité d'un traitement chronique avec un inhibiteur des ERK-MAPK pour prévenir l'hypertension. Cibler cette voie serait donc une stratégie thérapeutique intéressante puisque un tel traitement prévient la production de radicaux dans les tissus vasculaires et aussi a le potentiel de prévenir ou de ralentir les processus mitogéniques et hypertrophiques associés à la détérioration du système cardiovasculaire chez les patient hypertendus.

L'effet préventif de l'acide α -lipoïque sur l'augmentation de la pression artérielle dans notre modèle a aussi prouvé que l'anion superoxyde est un facteur déterminant dans le développement de l'hypertension induite par l'angiotensine II. Les effets antihypertenseurs du tempol, un analogue de la superoxyde dismutase, dans les modèles d'hypertension rénale impliquant une production d'angiotensine II ont été décrits dans plusieurs études en traitement aigu et en traitement chronique [530-532]. Le mécanisme par lequel l'anion superoxyde augmente la pression est cependant moins bien connu. Les effets aigus de l'anion superoxyde sur le tonus vasculaire sont probablement liés à sa capacité à réagir avec le NO, à induire des réponses inflammatoires ou à modifier l'activité de canaux calciques [533, 534]. Les effets hypertenseurs chroniques de l'anion superoxyde sont plutôt associés à moyen terme à une augmentation de la synthèse de protéines, par exemple l'angiotensinogène [535] ou l'endothéline [536], et à long terme à des changements morphologiques des vaisseaux et du coeur. Il est cependant étonnant de constater que dans l'étude HOPE les vitamines ne sont pas associées à une baisse de la pression artérielle ou une prévention des événements cardiovasculaires [458]. Ces résultats ne contredisent cependant pas nécessairement les hypothèses sur le rôle du stress oxydant dans l'hypertension établies à partir de modèles animaux, puisque les vitamines sont des antioxydants discutables capables de s'autooxyder à hautes concentrations et qui peuvent adopter des formes chimiques radicalaires réactives dans un milieu physiologique. Il faut cependant tenir compte du fait que les patients dans les études cliniques sont souvent déjà hypertendus que la majorité des études chez l'animal *in vivo* avec des antioxydants sont préventives et non régressives.

Nos études ont aussi permis de mieux décrire la dynamique de la production d'anion superoxyde. Nous avons observé que l'angiotensine II stimulait la production d'anion superoxyde selon un modèle biphasique (Chapitre 4, figure 2A). En effet, l'effet oxydant de l'angiotensine II dans les cellules de muscles lisses en culture est séparé en une période initiale transitoire de 1 heure et une période prolongée qui commence après 6 heures et se poursuit au-delà de 48 heures. Nous avons montré que la production d'anion superoxyde prolongée était dépendante de la synthèse de protéines et en particulier de la synthèse d'endothéline et la synthèse des sous-unités Nox4 de la NAD(P)H oxydase. Des études ont montré que la synthèse de l'endothéline pouvait être augmentée par la voie ERK-MAPK et l'anion superoxyde [536, 537].

Nos résultats expérimentaux permettent de décomposer les événements de la production d'anion superoxyde. Nous proposons l'hypothèse que l'effet de l'angiotensine II déclenche une augmentation rapide de l'activité ERK-MAPK qui ensuite entraîne une augmentation transitoire de la production de l'anion superoxyde par l'enzyme NAD(P)H oxydase. La voie ERK-MAPK ainsi que l'anion superoxyde induisent ensuite l'expression de la pré-pro-endothéline dans les cellules vasculaires. L'endothéline contribuerait à la surexpression de la NAD(P)H oxydase et à la production soutenue d'anion superoxyde. La présence d'anion superoxyde entraînerait ensuite une suractivation constitutive des voies tyrosines kinases, dont la voie ERK-MAPK (figure 1). Ce modèle est cohérent avec l'action des antagonistes des récepteurs de l'endothéline-1 qui ne bloquent pas la production d'anion superoxyde après 10 minutes de stimulation à l'angiotensine II, mais bloquent cette production après 6 heures. Ensuite, ce modèle

expliquerait pourquoi l'inhibition préventive de la voie ERK-MAPK ou de la production d'anion superoxyde sur des rats traités chroniquement à l'angiotensine II ont des effets équivalents sur la production d'anion superoxyde à court et à long terme.

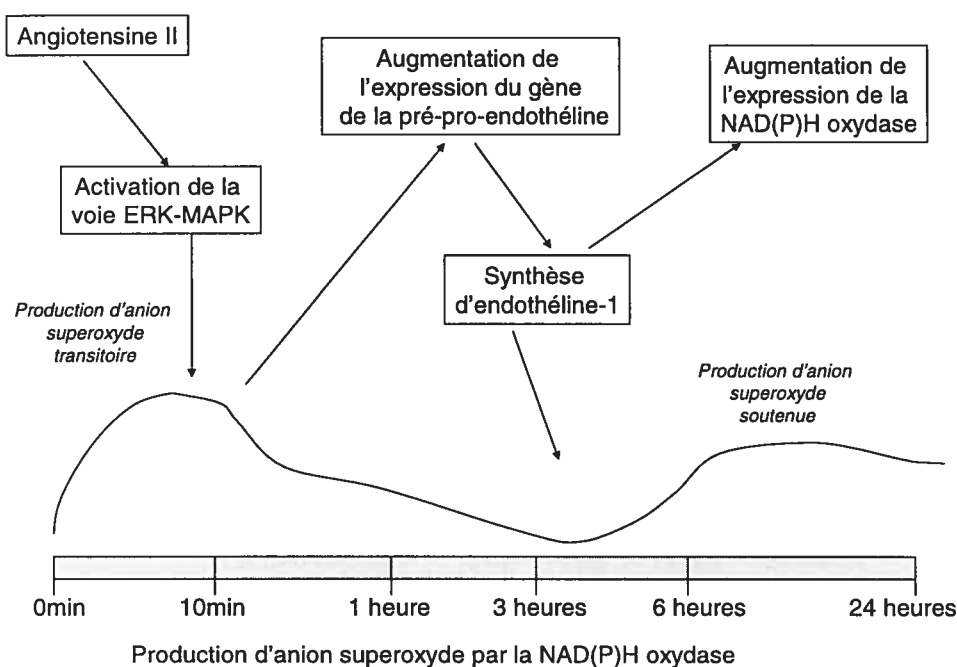


Figure 1 : La production d'anion superoxyde par l'angiotensine II est un phénomène biphasique. La phase transitoire initiale de la production d'anion superoxyde pourrait être un élément déclencheur de la mise en place des mécanismes responsables de la production d'anion superoxyde soutenue.

Bien que les interrelations entre l'angiotensine II et l'endothéline-1 dans les vaisseaux ont déjà fait l'objet de plusieurs études, le rôle de la synthèse de l'endothéline-1 dans la réponse oxydante de l'angiotensine II n'a jamais été étudié (figure 2). La provenance des radicaux produits par l'endothéline dans les vaisseaux n'est pas encore clairement définie, bien que la NAD(P)H oxydase a déjà été proposée comme source potentielle [400, 401].

Nos résultats ont montré qu'un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase, l'apocynine, pouvait empêcher l'augmentation de la production d'anion superoxyde (Chapitre 4, figure 4). Les mécanismes employés par l'endothéline pour activer la NAD(P)H oxydase restent cependant indéterminés. Nos études dans l'aorte ont montré que l'endothéline contribuait à l'augmentation de l'expression des sous-unités de la NAD(P)H oxydase, en particulier la Nox4, et ce mécanisme pourrait expliquer la production soutenue d'anion superoxyde observée.

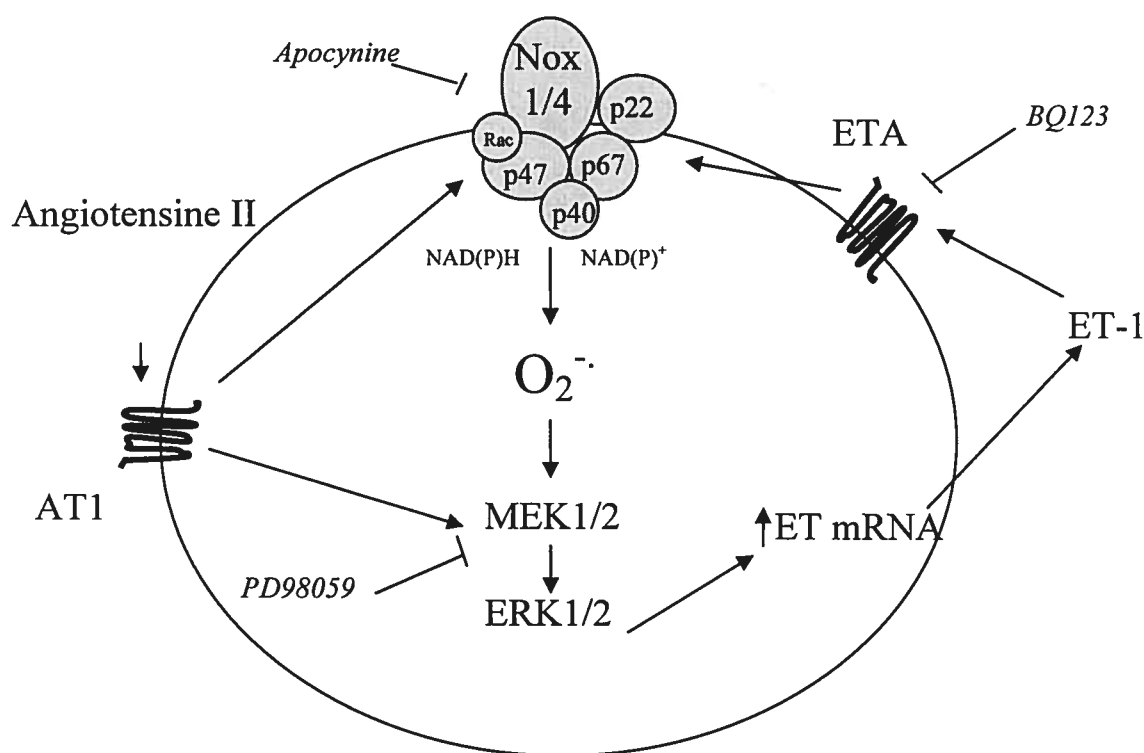


Figure 2 : L'interrelation entre l'angiotensine II et l'endothéline pour l'activation de la NAD(P)H oxydase.

Dans le suivi de l'évolution de la pression artérielle chez les rats traités à l'angiotensine II, le PD98059, le losartan et l'acide α -lipoïque ont donné de meilleurs résultats pour la prévention de l'augmentation de la pression artérielle qu'un antagoniste des récepteurs à endothéline, le LU302872, malgré une diminution de la production d'anion superoxyde comparable entre les produits (Voir Chapitre 3, figure 5 et Chapitre 4, figure 6A et B). Cet effet pourrait être expliqué par l'action des traitements antagonisant la voie ERK-MAPK, les récepteurs à angiotensine II et la production d'anion superoxyde sur la production rapide transitoire d'anion superoxyde alors que les antagonistes des récepteurs de l'endothéline ne préviennent que la production soutenue tardive d'anion superoxyde. Il est possible qu'une augmentation brève de la production de radicaux contribue à réguler l'expression de gènes pouvant participer par la suite à plusieurs processus pathologiques menant au développement de l'hypertension. Il reste que ces observations nous prouvent que le stress oxydant joue un rôle majeur dans le développement de l'hypertension, mais que la pression artérielle d'un animal à un moment précis n'est pas directement dépendante de la quantité de radicaux produits dans les tissus.

En plus du rôle des tyrosines kinases, de la voie ERK-MAPK et de la synthèse de l'endothéline-1 dans la production de l'anion superoxyde par l'angiotensine II, nous nous sommes aussi intéressés au rôle des cyclooxygénases comme intermédiaires des voies de signalisation de l'angiotensine II dans l'activation de la NAD(P)H oxydase. Cette hypothèse a été proposée après avoir observé les effets de l'aspirine sur la production d'anion superoxyde dans les aortes de rats spontanément hypertendus [261].

L'angiotensine II augmente l'expression de la COX2 et cette surexpression a été associée à l'activation de la NAD(P)H oxydase et à la production d'anion superoxyde [265]. La cyclooxygénase utilise des acides gras insaturés, en particulier des oméga-3 et 6, comme substrats pour produire des prostanoïdes. Les acides gras sous forme triglycéride sont présents en quantité importante dans la circulation et sont hydrolysés en formes libres à l'intérieur des cellules. Il était donc possible que la nature et la concentration sanguine et tissulaire des oméga soient déterminantes pour la production de stress oxydant par l'angiotensine II.

Nos études sur les cellules de muscles lisses vasculaires en culture ont montré que l'acide arachidonique et aussi l'acide linoléique, deux oméga-6, pouvaient augmenter la production d'anion superoxyde après un traitement prolongé de 48 heures (chapitre 5, figure 1A). Cependant, nos études sur les cellules de muscles lisses ont montré un effet négligeable des inhibiteurs des cyclooxygénases sur la production d'anion superoxyde par l'acide arachidonique et la NAD(P)H n'était pas suractivée suite à ce traitement (Chapitre 5, figure 3b et 5b). D'ailleurs, l'apocynine, un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase, n'a aucun effet préventif sur la production d'anion superoxyde augmentée par un traitement à l'acide arachidonique.

Contrairement à notre hypothèse initiale, la production de l'anion superoxyde augmentée par les oméga-6 est indépendante des voies cellulaires activées par l'angiotensine II. Cette observation est intéressante, puisque la production d'anion superoxyde par les oméga-6 est potentiellement additive à celle stimulée par l'angiotensine II. D'ailleurs, un

traitement combiné avec l'acide arachidonique et l'angiotensine II augmente la production d'anion superoxyde à des niveaux supérieurs comparativement aux traitements séparés (figure 3).

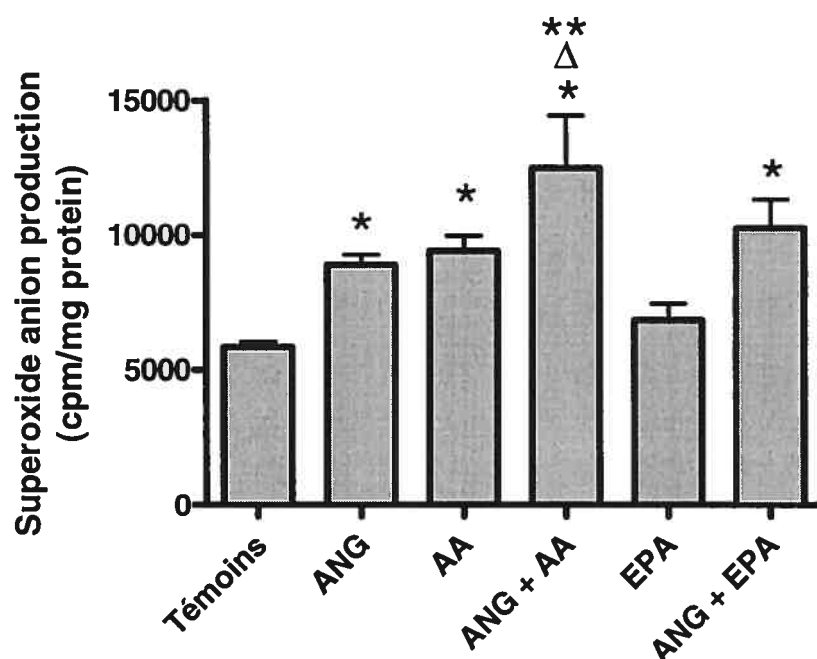


Figure 3 (données non publiées) : Mesure de la production de l'anion superoxyde de cellules de muscles lisses vasculaires en culture traitées à l'angiotensine en combinaison avec de l'EPA (un oméga-3) et de l'AA (un oméga-6).

Les cellules ont été traitées 48 heures par des concentrations de 10^{-6} M d'angiotensine II et de 50 μ M d'EPA et de DHA. Les mesures ont été faites dans des fioles de verre avec une suspension cellulaires dans une solution de lucigénine de 5 μ M (voir annexe 1). EPA = Acide eicosapentaénoïque, ANG = Angiotensine II, AA = Acide Arachidonique. Les erreurs représentent les écarts-types. * $P < 0,001$ vs Témoins, Δ $P < 0,001$ vs ANG, ** $P < 0,001$ vs AA. N=8.

Les oméga-3 sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire et le mécanisme couramment proposé pour expliquer cet effet est la compétition entre les oméga-6 et les oméga-3 pour leur utilisation par des enzymes métabolisant l'acide arachidonique. Les oméga-3 ont une plus grande affinité pour ces enzymes, sont métabolisés plus lentement et forment des produits alternatifs (les prostanoïdes de série 3 et les leucotriènes de série 5) qui sont inactifs ou qui ont des effets opposés aux produits des oméga-6. Nos expériences supportent cette hypothèse puisque deux oméga-3 différents, l'EPA et le DHA, préviennent les effets oxydants de l'acide arachidonique et cet effet est dose dépendant (Chapitre 5, figure 1A et B). Nous avons aussi montré cet effet préventif des oméga-3 avec une autre méthode de mesure de l'anion superoxyde avec la dihydroéthidine (figure 4). Il est toutefois à noter que les oméga-3 ne sont pas des antioxydants. À fortes doses, il a été rapporté que les oméga-3 favorisent la peroxydation des lipides chez le rat [517]. Nous avons montré que l'EPA était incapable de prévenir la production d'anion superoxyde par l'angiotensine (figure 3). En général, nos résultats montrent que les oméga-3 tendent à augmenter faiblement les niveaux basaux d'anion superoxyde bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative.

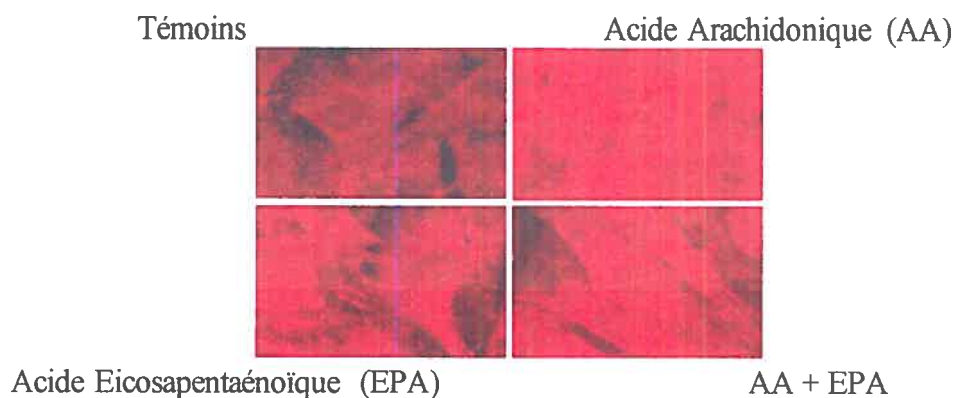


Figure 4 (données non-publiées) : Mesure de l'anion superoxyde par la dihydroéthidine dans des cellules de muscles lisses vasculaires.

Des cellules de muscles lisses ont été cultivées sur des lamelles de verre dans un milieu DMEM 10% FBS (Invitrogen Canada Inc, Ontario). À 75% de confluence, les lamelles ont été soumises aux traitements avec 50 μ M d'EPA et de AA (Sigma Chemical Co, St-Louis) pendant 48 heures dans du milieu 0,1% FBS. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de dihydroéthidine 20 μ M (Molecular Probes-Invitrogen Canada Inc, Ontario) pendant 15 minutes. Les cellules ont été lavées dans du tampon PBS phosphate salin et fixées avec une solution de paraformaldéhyde 10%. Les lamelles ont été exposées à un rayon lumineux de 488 nm et la lumière émise entre 610-630 nm a été mesurée par microscopie à fluorescence avec un microscope confocal (Leica Microsystems Inc, Richmond Hill, Ontario).

Nos études ont donc permis d'identifier clairement les effets respectifs des oméga-3 et 6 sur la production d'anion superoxyde dans les cellules de muscles lisses vasculaires. Pour identifier la source de cette production d'anion superoxyde, nous nous sommes intéressés à d'autres enzymes utilisant l'acide arachidonique comme substrat : les voies des 5,12,15-lipoxygénases et des cytochromes p450 monooxygénases. Des inhibiteurs de la 12-lipoxygénase (acide caféique et baicaléine) ont pu prévenir la production d'anion superoxyde augmentée par l'acide arachidonique alors qu'un inhibiteur des 5,15-lipoxygénases (NDGA) n'a pas eu d'effet. Le mécanisme de production de l'anion superoxyde produit par la 12-lipoxygénase est cependant inconnu. Les rôles physiologiques exacts de la 12-lipoxygénase n'ont jamais été déterminés, mais un produit majeur de la 12-lipoxygénase, le 12-HETE, pourrait jouer un rôle dans l'oxydation des LDL [295] et la production d'anion superoxyde [294].

Un inhibiteur des cytochromes p450 CYP2C, le sulfaphénazole, a aussi prévenu en partie la production d'anion superoxyde par l'acide arachidonique. Cet inhibiteur a précédemment été utilisé pour prévenir la production d'anion superoxyde dans des cœurs de rats soumis à des ischémies/reperfusions [538]. Cette production d'anion superoxyde proviendrait soit directement du cytochrome ou soit d'un produit de cette enzyme.

Suivant nos observations sur des cultures cellulaires, nous avons donc voulu savoir si des régimes avec des ratios différents oméga-6/oméga-3 pouvaient faire varier la production vasculaire d'anion superoxyde chez le rat. Nos expériences ont effectivement montré qu'un régime de 6 semaines avec un ratio oméga-6/oméga-3 élevé pouvait augmenter la

production aortique d'anion superoxyde (Chapitre 5, figure 5). Cette production n'était pas accompagnée d'une augmentation de la pression artérielle (Chapitre 5, figure 3). Ce résultat montre, comme dans le cas des traitements au LU302872 de rats hypertendus par infusion d'angiotensine II, que la production d'anion superoxyde dans les vaisseaux des rats n'est pas reliée directement à la pression artérielle. Il est cependant possible qu'un prolongement de la durée du régime puisse éventuellement causer une augmentation de la pression artérielle. Une autre hypothèse pour expliquer la présence d'une quantité élevée de stress oxydant dans les vaisseaux d'un animal normotendu serait que les effets sur la production d'anion superoxyde vasculaire soient compensés par les effets des oméga-6 sur d'autres systèmes reliés au réseau cardiovasculaire. Le rythme cardiaque est par exemple diminué par une diète riche en oméga-6 [473]. Nous avons d'ailleurs observé une baisse du rythme cardiaque chez les rats recevant des régimes contenant de l'acide arachidonique et du DHA.

La concentration et les proportions entre les acides gras oméga-6 et oméga-3 dans la diète seraient donc des facteurs indépendants de la signalisation de l'angiotensine II pouvant causer une augmentation de la production d'anion superoxyde dans les vaisseaux. Le ratio oméga-6/oméga-3 dans le régime alimentaire devrait donc être considéré comme un facteur de risque cardiovasculaire potentiel si l'on considère le rôle de l'anion superoxyde dans le développement des maladies vasculaires. Selon les études épidémiologiques et cliniques sur le sujet, un régime avec un apport énergétique de 6% provenant d'oméga-6 et de 1% d'oméga-3 a été suggéré comme étant raisonnable et protecteur des maladies

coronariennes [539]. Cet objectif peut être atteint en diminuant la proportion d'aliments frits et en augmentant la consommation de poisson dans le régime quotidien.

Les études sur la production de radicaux au niveau vasculaire soulignent l'existence de sources variées, souvent parallèles et intégrées au fonctionnement normal et pathologique des voies de signalisation cellulaires. L'anion superoxyde est ainsi capable de contribuer au développement de l'hypertension, mais n'est pas nécessairement associé à une augmentation de pression artérielle. Il existe néanmoins un vaste éventail de cibles sur lesquelles agir pour prévenir ou diminuer la production de radicaux dans les tissus cardiovasculaires. Le défi sera d'intégrer les connaissances dont nous disposons sur les sources et les effets des radicaux afin d'adopter les stratégies appropriées selon les patients dans le traitement ou la prévention des maladies cardiovasculaires.

CHAPITRE VII**Conclusion**

CHAPITRE VII – CONCLUSION

L'implication de la production d'anion superoxyde dans le développement de l'hypertension et des maladies cardiovasculaires est bien établie, mais les mécanismes par lesquels ce radical exerce ses actions sont moins bien définis.

Nos travaux décrivent deux voies de signalisation majeures de la production de l'anion superoxyde dans les vaisseaux. D'abord, l'angiotensine II qui est une hormone importante dans le développement et le maintien de l'hypertension et est produite par le système rénine-angiotensine-aldostérone. Ensuite, les acides gras de type oméga-6 qui proviennent de l'alimentation et exercent un effet nocif sur les vaisseaux, particulièrement lorsque le rapport alimentaire oméga-6/oméga-3 est élevé.

L'angiotensine II possède la capacité d'activer la voie ERK-MAPK et la production d'anion superoxyde en augmentant l'activité et l'expression de la NAD(P)H oxydase dans les cellules de muscles lisses vasculaires d'aorte. L'inhibition des voies tyrosines kinases, de la voie ERK-MAPK ou un traitement antioxydant préviennent l'augmentation de la pression artérielle. Nous avons donc démontré que le développement de l'hypertension par l'angiotensine II est contrôlé par la voie ERK-MAPK et la production de l'anion superoxyde.

La production de l'anion superoxyde par l'angiotensine II est un phénomène biphasique, constitué d'une production transitoire rapide et d'une production soutenue.

L'augmentation de la synthèse de l'endothéline-1 stimulée par l'angiotensine II et la stimulation des récepteurs de l'endothéline est une étape importante dans la production soutenue d'anion superoxyde. L'endothéline-1 augmente l'expression et l'activité de la NAD(P)H oxydase. Cependant, un antagoniste des récepteurs de l'endothéline n'a prévenu que partiellement l'augmentation de pression artérielle provoquée par un traitement à l'angiotensine II. La réponse oxydante, mais non la réponse hypertensive à long terme de l'angiotensine II est totalement dépendante de la synthèse d'endothéline-1.

Finalement, malgré plusieurs voies communes entre les récepteurs de l'angiotensine II et les voies reliées à l'acide arachidonique, entre autres l'expression des cyclooxygénases, la production des radicaux libres par les oméga-6 est indépendante de la signalisation de l'angiotensine II. Cette production est plutôt contrôlée par l'activité de la 12-lipoxygénase et par l'activité des cytochromes p450. Les oméga-3 préviennent les effets oxydants des oméga-6 autant dans les cellules de muscles lisses en culture que dans les aortes de rats. Toutefois, une diète riche en oméga-6 et faible en oméga-3 n'est pas suffisante pour produire une augmentation de la pression artérielle après 6 semaines de traitements.

Ces études ouvrent une perspective pour l'utilisation de voies et de cibles pour prévenir la production d'anion superoxyde dans les tissus vasculaires. Des inhibiteurs d'ERK-MAPK, de 12-lipoxygénase, de NAD(P)H oxydase, de l'endothéline-1 et des cytochromes p450 sont tous des mécanismes potentiels pouvant servir de cibles à des traitements antioxydants. Compte tenu du potentiel surtout préventif des thérapies

antioxydantes, une approche nutritionnelle favorisant l'intégration de composés alimentaires contenant des inhibiteurs de ces voies de signalisation ou des proportions différentes d'acides gras dans le régime quotidien des patients serait à étudier. Une attention particulière devrait être portée à l'impact d'un régime à ratio oméga-6/oméga-3 élevé. En effet, compte tenu de l'omniprésence des oméga-6 et de la faible concentration des oméga-3 dans le régime alimentaire des nord-américains en général, il serait pertinent de définir le risque cardiovasculaire qu'une telle situation pourrait entraîner.

CHAPITRE VIII

Sources bibliographiques

CHAPITRE VIII – SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Global Cardiovascular Infobase . 2000.
http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/en/
2. Rodgers A, Ezzati M, Vander HS, Lopez AD, Lin RB, Murray CJ. Distribution of major health risks: findings from the Global Burden of Disease study. *PLoS Med* 2004; **1**(1):e27.
3. Dawber TR, Meadors GF, Moore FE, Jr. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health* 1951; **41**(3):279-281.
4. Ecological analysis of the association between mortality and major risk factors of cardiovascular disease. The World Health Organization MONICA Project. *Int J Epidemiol* 1994; **23**(3):505-516.
5. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; **289**(19):2560-2572.
6. van Zwieten P.A., Mancia G. *The metabolic syndrome - a therapeutic challenge*. Alphen aan den Rijn, the Netherlands: Van Zuiden Communications; 2005.
7. MRFIT. Multiple risk factor intervention trial for the prevention of coronary heart disease (MRFIT). *J Med Soc N J* 1975; **72**(4):339.
8. Eberly LE, Prineas R, Cohen JD, Vazquez G, Zhi X, Neaton JD, et al. Metabolic syndrome: risk factor distribution and 18-year mortality in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care* 2006; **29**(1):123-130.
9. Franco OH, Peeters A, Bonneux L, de LC. Blood pressure in adulthood and life expectancy with cardiovascular disease in men and women: life course analysis. *Hypertension* 2005; **46**(2):280-286.
10. Domanski M, Mitchell G, Pfeffer M, Neaton JD, Norman J, Svendsen K, et al. Pulse pressure and cardiovascular disease-related mortality: follow-up study of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 2002; **287**(20):2677-2683.
11. Corcoran AC, Dustan HP, Lewis LA, Page IH. Atherosclerotic complications in hypertensive disease. *Ann N Y Acad Sci* 1956; **64**(4):620-629.
12. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; **365**(9455):217-223.

13. Joffres MR, Hamet P, MacLean DR, L'italien GJ, Fodor G. Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am J Hypertens* 2001; **14**(11 Pt 1):1099-1105.
14. Tunstall-Pedoe H, Connaghan J, Woodward M, Tolonen H, Kuulasmaa K. Pattern of declining blood pressure across replicate population surveys of the WHO MONICA project, mid-1980s to mid-1990s, and the role of medication. *BMJ* 2006; **332**(7542):629-635.
15. Hajjar I, Kotchen T. Regional variations of blood pressure in the United States are associated with regional variations in dietary intakes: the NHANES-III data. *J Nutr* 2003; **133**(1):211-214.
16. Cooper R, Cutler J, svigne-Nickens P, Fortmann SP, Friedman L, Havlik R, et al. Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the United States: findings of the national conference on cardiovascular disease prevention. *Circulation* 2000; **102**(25):3137-3147.
17. Canadian Recommendations for the Management of Hypertension. 2006. Canadian Hypertension Education Program.
18. Taylor R, Lewis ND, Levy S. Societies in transition: mortality patterns in Pacific Island populations. *Int J Epidemiol* 1989; **18**(3):634-646.
19. Russell-Jones DL, Hoskins P, Kearney E, Morris R, Katoaga S, Slavin B, et al. Rural/urban differences of diabetes--impaired glucose tolerance, hypertension, obesity, glycosolated haemoglobin, nutritional proteins, fasting cholesterol and apolipoproteins in Fijian Melanesians over 40. *Q J Med* 1990; **74**(273):75-81.
20. Strazzullo P, Ferro-Luzzi A, Siani A, Scaccini C, Sette S, Catasta G, et al. Changing the Mediterranean diet: effects on blood pressure. *J Hypertens* 1986; **4**(4):407-412.
21. McCullough ML, Chevaux K, Jackson L, Preston M, Martinez G, Schmitz HH, et al. Hypertension, the Kuna, and the Epidemiology of Flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; **47** Suppl 2:S103-S109.
22. Hamilton M, Pickering GW, Roberts JA, Sowry GS. The aetiology of essential hypertension. I. The arterial pressure in the general population. *Clin Sci (Lond)* 1954; **13**(1):11-35.
23. Avolio AP, Deng FQ, Li WQ, Luo YF, Huang ZD, Xing LF, et al. Effects of aging on arterial distensibility in populations with high and low prevalence of hypertension: comparison between urban and rural communities in China. *Circulation* 1985; **71**(2):202-210.

24. Kuznetsova T, Staessen JA, Brand E, Cwynar M, Stolarz K, Thijs L, et al. Sodium excretion as a modulator of genetic associations with cardiovascular phenotypes in the European Project on Genes in Hypertension. *J Hypertens* 2006; **24**(2):235-242.
25. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev* 1997; **77**(1):75-197.
26. Campbell A, Robertson E. Treatment of severe hypertension with hexamethonium bromide. *Br Med J* 1950; **2**(4683):804-806.
27. Freis ED, Partenope E, Lilienfield L, Rose J. A clinical appraisal of pentapyrrolidinium (M&B 2050) in hypertensive patients. *Circulation* 1954; **9**(4):540-546.
28. Freis E. Antihypertensive therapy. *Molecular modification in drug design*: American Chemical Society; 1964, pp. 67-76.
29. Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990; **335**(8693):827-838.
30. Katz AM. Molecular biology of calcium channels in the cardiovascular system. *Am J Cardiol* 1997; **80**(9A):17I-22I.
31. Kaplan NM. Antihypertensive drugs: how different classes can impact patients' coronary heart disease risk profile and quality of life. *Am J Med* 1987; **82**(1A):9-14.
32. HALLHAT. Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). ALLHAT Collaborative Research Group. *JAMA* 2000; **283**(15):1967-1975.
33. Khan NA, McAlister FA, Rabkin SW, Padwal R, Feldman RD, Campbell NR, et al. The 2006 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: Part II - Therapy. *Can J Cardiol* 2006; **22**(7):583-593.
34. Capron L., Wyplosz B. Athérosclérose : description, mécanismes et étiologie. *Encycl Med Chir* 19[0090], 1-10. 1999.
Ref Type: Magazine Article
35. Packard CJ, Shepherd J. Physiology of the lipoprotein transport system: an overview of the lipoprotein metabolism. London: Hodder Headline Group; 1999.

36. Sinclair HM. Prevention of coronary heart disease: the role of essential fatty acids. *Postgrad Med J* 1980; **56**(658):579-584.
37. Goldstein JL, Brown MS. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism* 1977; **26**(11):1257-1275.
38. Goldstein JL, Kita T, Brown MS. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1983; **309**(5):288-296.
39. Kita T, Brown MS, Watanabe Y, Goldstein JL. Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**(4):2268-2272.
40. Tanzawa K, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Arai M, Watanabe H. WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS Lett* 1980; **118**(1):81-84.
41. Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* 1986; **2**(8513):933-936.
42. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981; **212**(4495):628-635.
43. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 1976; **72**(2):323-326.
44. Schoenhagen P, Tuzcu EM, pperson-Hansen C, Wang C, Wolski K, Lin S, et al. Determinants of arterial wall remodeling during lipid-lowering therapy: serial intravascular ultrasound observations from the Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering Therapy (REVERSAL) trial. *Circulation* 2006; **113**(24):2826-2834.
45. Jaouad L, de GC, Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, Fulop T, et al. Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis* 2006; **185**(1):191-200.
46. Miller GJ, Miller NE, Ashcroft MT. Inverse relationship in Jamaica between plasma high-density lipoprotein cholesterol concentration and coronary-disease risk as predicted by multiple risk-factor status. *Clin Sci Mol Med* 1976; **51**(5):475-482.

47. Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM* 2005; **98**(12):845-856.
48. Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, Bowers TK, Jacob HS. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. *J Clin Invest* 1978; **61**(5):1161-1167.
49. Weiss SJ, Young J, LoBuglio AF, Slivka A, Nimeh NF. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1981; **68**(3):714-721.
50. Joris I, Zand T, Majno G. Hydrodynamic injury of the endothelium in acute aortic stenosis. *Am J Pathol* 1982; **106**(3):394-408.
51. Wallenfeldt K, Fagerberg B, Wikstrand J, Hulthe J. Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically healthy men. *J Intern Med* 2004; **256**(5):413-420.
52. Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2003; **1010**:698-709.
53. Ball RY, Bindman JP, Carpenter KL, Mitchinson MJ. Oxidized low density lipoprotein induces ceroid accumulation by murine peritoneal macrophages in vitro. *Atherosclerosis* 1986; **60**(2):173-181.
54. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; **100**(11):2680-2690.
55. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Mahrer PR, Sevanian A, Liu CR, et al. Alpha-tocopherol supplementation in healthy individuals reduces low-density lipoprotein oxidation but not atherosclerosis: the Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study (VEAPS). *Circulation* 2002; **106**(12):1453-1459.
56. Ross R. Mechanisms of atherosclerosis--a review. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1990; **19**:79-86.
57. Benditt EP, Barrett T, McDougall JK. Viruses in the etiology of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**(20):6386-6389.
58. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; **180**(93):1332-1339.

59. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993; **171**(3):223-229.
60. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; **243**(4895):1160-1165.
61. Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC, et al. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**(8):1517-1520.
62. Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1988; **82**(6):2045-2055.
63. Gow BS. Viscoelastic properties of conduit arteries. *Circ Res* 1970; **27**:Suppl.
64. Cooper A, Heagerty AM. Blood pressure parameters as determinants of small artery structure in human essential hypertension. *Clin Sci (Lond)* 1997; **92**(6):551-557.
65. Kannel WB, Kannel C, Paffenbarger RS, Jr., Cupples LA. Heart rate and cardiovascular mortality: the Framingham Study. *Am Heart J* 1987; **113**(6):1489-1494.
66. Walsh JA, Hyman C, Maronde RF. Venous distensibility in essential hypertension. *Cardiovasc Res* 1969; **3**(3):338-349.
67. Oberg B. The relationship between active constriction and passive recoil of the veins at various distending pressures. *Acta Physiol Scand* 1967; **71**(2):233-247.
68. Mellander S. Systemic circulation: local control. *Annu Rev Physiol* 1970; **32**:313-344.
69. Stainsby WN. Autoregulation of blood flow in skeletal muscle during increased metabolic activity. *Am J Physiol* 1962; **202**:273-276.
70. Duran WN. Effects of muscle contraction and of adenosine on capillary transport and microvascular flow in dog skeletal muscle. *Circ Res* 1977; **41**(5):642-647.

71. Belloni FL, Phair RD, Sparks HV. The role of adenosine in prolonged vasodilation following flow-restricted exercise of canine skeletal muscle. *Circ Res* 1979; **44**(6):759-766.
72. Berne RM. Regulation of coronary blood flow. *Physiol Rev* 1964; **44**:1-29.
73. Waugh WH, Shanks RG. Cause of genuine autoregulation of the renal circulation. *Circ Res* 1960; **8**:871-888.
74. Green HD, Rapela CE, Conrad MC. Resistance (conductance) and capacitance phenomena in terminal vascular beds. *Handbook of Physiology*. Washington DC: American Physiology Society; 1963, p. 935.
75. Bayliss WN. On the local reactions of the arterial wall to changes in internal pressure. *J Physiol* 28[220]. 1902.
Ref Type: Magazine Article
76. Folkow B. Description of the myogenic hypothesis. *Circ Res* 1964; **15**:SUPPL-87.
77. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; **288**(5789):373-376.
78. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; **327**(6122):524-526.
79. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996; **78**(3):415-423.
80. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999; **401**(6752):493-497.
81. Yang D, Feletou M, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension* 2003; **41**(1):143-148.
82. Gluais P, Lonchampt M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 2005; **146**(6):834-845.
83. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999; **61**:391-415.

84. Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1990; **1**(9):649-659.
85. Haddy FJ, Scott JB. Bioassay and other evidence for participation of chemical factors in local regulation of blood flow. *Circ Res* 1971; **28**:Suppl-92.
86. Thibonnier M, Sassano P, Daufresne S, Corvol P, Menard J. Osmoregulation and renal effects of vasopressin in normal and mildly hypertensive subjects. *Kidney Int* 1984; **25**(2):411-415.
87. Rocha M, Silva. Bradykinin; mechanism of its release by trypsin and kallikrein. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1951; **88**(3):271-282.
88. de Champlain J, Van Ameringen MR. Regulation of blood pressure by sympathetic nerve fibers and adrenal medulla in normotensive and hypertensive rats. *Circ Res* 1972; **31**(4):617-628.
89. Buggy J, Fink GD, Haywood JR, Johnson AK, Brody MJ. Interruption of the maintenance phase of established hypertension by ablation of the anteroventral third ventricle (AV3V) in rats. *Clin Exp Hypertens* 1978; **1**(3):337-353.
90. Leiter L, Grinker RR. Role of the hypothalamus in regulation of blood pressure: Experimental studies, with observations on respiration. *Arch Neurol Psych* 31[54]. 1934.
91. Langer SZ. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol* 1974; **23**(13):1793-1800.
92. Dampney RA, Kumada M, Reis DJ. Central neural mechanisms of the cerebral ischemic response. Characterization, effect of brainstem and cranial nerve transections, and simulation by electrical stimulation of restricted regions of medulla oblongata in rabbit. *Circ Res* 1979; **45**(1):48-62.
93. Faber JE, Brody MJ. Central nervous system action of angiotensin during onset of renal hypertension in awake rats. *Am J Physiol* 1984; **247**(3 Pt 2):H349-H360.
94. Grassi G. Renin-angiotensin-sympathetic crosstalks in hypertension: reappraising the relevance of peripheral interactions. *J Hypertens* 2001; **19**(10):1713-1716.
95. Tigerstedt R BPG. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol*. 8, 223-271. 1898.
96. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 59, 347-380. 1934.

97. Pickering GW, Prinzmetal M. Some observations on renin, a pressor substance contained in normal kidney, together with a method for its biological assay. *Clin Sci* 3, 211-227. 1938.
98. Braun-Menéndez E FJLLMJTAC. *Hipertensión Arterial Nefrónica*. 1943. Buenos Aires, Argentina: El Ateneo.
99. Skeggs LT, Jr., Kahn JR, Lentz K, Shumway NP. The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J Exp Med* 1957; **106**(3):439-453.
100. Skeggs LT, Jr., Lentz KE, Kochstrasser H, Kahn JR. the chemistry of renin substrate. *Can Med Assoc J* 1964; **90**:185-189.
101. Skeggs LT, Jr., Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. Amino acid composition and electrophoretic properties of hypertensin I. *J Exp Med* 1955; **102**(4):435-440.
102. Skeggs LT, Jr., Lentz KE, Kahn JR, Shumway NP, Woods KR. The amino acid sequence of hypertensin. II. *J Exp Med* 1956; **104**(2):193-197.
103. Gardes J, Bouhnik J, Clauser E, Corvol P, Menard J. Role of angiotensinogen in blood pressure homeostasis. *Hypertension* 1982; **4**(2):185-189.
104. Taugner R, Hackenthal E, Nobiling R, Harlacher M, Reb G. The distribution of renin in the different segments of the renal arterial tree: immunocytochemical investigation in the mouse kidney. *Histochemistry* 1981; **73**(1):75-88.
105. Vander AJ, Luciano JR. Neural and humoral control of renin release in salt depletion. *Circ Res* 1967; **21**(1):Suppl-77.
106. Skeggs LT, Jr., Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 1956; **103**(3):295-299.
107. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; **417**(6891):822-828.
108. Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, Kokkonen JO. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **278**(4):H1069-H1074.
109. Decarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 1996; **271**(4 Pt 2):H1340-H1347.

110. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Scholkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 1995; **47**(1):25-49.
111. Ganten D, Hayduk K, Brecht HM, Boucher R, Genest J. Evidence of renin release or production in splanchnic territory. *Nature* 1970; **226**(5245):551-552.
112. Deboen A, Inagami T, Ganten D. Tissue renin. In: McGraw Hill (editor): *Hypertension-Physiolopathology and Treatment* edited by Genest J, Kuchel O, Hamet P, Cantin M. New York; 1983, pp. 194-209.
113. Brown JJ, Chapuis G, Robertson JL. The effect of prolonged intravenous infusion of angiotensin in the rabbit. *Clin Sci* 1964; **26**:165-175.
114. Dickinson CJ, Yu R. The progressive pressor response to angiotensin in the rabbit. *J Physiol* 1967; **190**(1):91-99.
115. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **165**(1):196-203.
116. Shirai H, Takahashi K, Katada T, Inagami T. Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 1995; **25**(4 Pt 2):726-730.
117. Sayeski PP, Ali MS, Semeniuk DJ, Doan TN, Bernstein KE. Angiotensin II signal transduction pathways. *Regul Pept* 1998; **78**(1-3):19-29.
118. Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB, Bernstein KE. Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**(37):23382-23388.
119. Frank GD, Saito S, Motley ED, Sasaki T, Ohba M, Kuroki T, et al. Requirement of Ca(2+) and PKCdelta for Janus kinase 2 activation by angiotensin II: involvement of PYK2. *Mol Endocrinol* 2002; **16**(2):367-377.
120. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, et al. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998; **273**(15):8890-8896.
121. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; **292**(1):C82-C97.

122. Kang J, Posner P, Summers C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 1994; **267**(5 Pt 1):C1389-C1397.
123. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**(1):156-160.
124. Arun KH, Kaul CL, Poduri R. Tempol augments angiotensin II-induced AT₂ receptor-mediated relaxation in diabetic rat thoracic aorta. *J Hypertens* 2004; **22**(11):2143-2152.
125. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985; **248**(5 Pt 1):C550-C556.
126. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(8):2863-2867.
127. Shimada K, Takahashi M, Tanzawa K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; **269**(28):18275-18278.
128. Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; **81**(6):503-510.
129. Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; **32 Suppl 3**:S2-13.
130. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; **348**(6303):730-732.
131. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; **348**(6303):732-735.
132. Miwa S, Iwamuro Y, Zhang XF, Inoki T, Okamoto Y, Okazawa M, et al. Ca²⁺ entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn J Pharmacol* 1999; **80**(4):281-288.
133. Moreland S, McMullen DM, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **184**(1):100-106.

134. Russell FD, Davenport AP. Characterization of endothelin receptors in the human pulmonary vasculature using bosentan, SB209670, and 97-139. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **26 Suppl 3**:S346-S347.
135. Moreau P, Nava E, Takase H, Luscher TF. Local regulation of vascular function: focus on endothelium-dependent mechanisms in normotension, hypertension and atherosclerosis. In: Zanchetti A, Mancia G (editors): *Pathophysiology of Hypertension*. Amsterdam: Elsevier; 1997, pp. 975-1006.
136. Cardillo C, Campia U, Kilcoyne CM, Bryant MB, Panza JA. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. *Circulation* 2002; **105**(4):452-456.
137. Wright CE, Fozard JR. Regional vasodilation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anaesthetized, spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1988; **155**(1-2):201-203.
138. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988; **238**(2):249-252.
139. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 1988; **255**(4 Pt 2):H970-H973.
140. Wiklund NP, Ohlen A, Cederqvist B. Inhibition of adrenergic neuroeffector transmission by endothelin in the guinea-pig femoral artery. *Acta Physiol Scand* 1988; **134**(2):311-312.
141. Leslie SJ, Webb DJ. Endothelin ligands and their experimental effects in the human circulation. In: Warner TD (editor): *Endothelin and its inhibitors*: Springer; 2001, pp. 503-520.
142. Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Imai T, et al. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 1991; **18**(2):165-170.
143. Dohi Y, Hahn AW, Boulanger CM, Buhler FR, Luscher TF. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* 1992; **19**(2):131-137.
144. Lariviere R, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Boucher D. Effects of losartan and captopril on endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *Am J Hypertens* 1998; **11**(8 Pt 1):989-997.

145. Boulton TG, Cobb MH. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 1991; **2**(5):357-371.
146. Ushiro H, Cohen S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* 1980; **255**(18):8363-8365.
147. Kasuga M, Zick Y, Blithe DL, Crettaz M, Kahn CR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature* 1982; **298**(5875):667-669.
148. Ek B, Ronnstrand L, Heldin CH. Stimulation of tyrosine phosphorylation by platelet-derived growth factor. *Biochem Soc Trans* 1984; **12**(5):759-762.
149. Maher PA. Nerve growth factor induces protein-tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**(18):6788-6791.
150. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 1988; **55**(2):301-308.
151. Rozakis-Adcock M, McGlade J, Mbamalu G, Pelicci G, Daly R, Li W, et al. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 1992; **360**(6405):689-692.
152. Olivier JP, Raabe T, Henkemeyer M, Dickson B, Mbamalu G, Margolis B, et al. A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* 1993; **73**(1):179-191.
153. Crews CM, Erikson RL. Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(17):8205-8209.
154. Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 1988; **334**(6184):715-718.
155. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; **65**(4):663-675.

156. Anhe GF, Torrao AS, Nogueira TC, Caperuto LC, Amaral ME, Medina MC, et al. ERK3 associates with MAP2 and is involved in glucose-induced insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 2006.
157. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1995; **270**(21):12665-12669.
158. Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 1999; **274**(37):26563-26571.
159. Sun HY, Wang NP, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, et al. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis* 2006.
160. Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1998; **30**(9):1789-1801.
161. Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; **31**(8):1429-1434.
162. Collett MS, Erikson RL. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; **75**(4):2021-2024.
163. Erpel T, Courtneidge SA. Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**(2):176-182.
164. Jo H, Sipos K, Go YM, Law R, Rong J, McDonald JM. Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi2- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* 1997; **272**(2):1395-1401.
165. Belcheva MM, Vogel Z, Ignatova E, vidor-Reiss T, Zippel R, Levy R, et al. Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is ras-dependent and involves Gbetagamma subunits. *J Neurochem* 1998; **70**(2):635-645.
166. Ishida M, Marrero MB, Schieffer B, Ishida T, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; **77**(6):1053-1059.

167. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; **270**(5240):1326-1331.
168. Touyz RM, He G, El MM, Diep Q, Mardigyan V, Schiffrin EL. Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT1 receptors in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; **19**(3 Pt 2):553-559.
169. Matrougui K, Eskildsen-Helmond YE, Fiebeler A, Henrion D, Levy BI, Tedgui A, et al. Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 2000; **36**(4):617-621.
170. Satake N, Imanishi M, Shibata S. Increased nitroglycerin-induced relaxation by genistein in rat aortic rings. *Eur J Pharmacol* 1999; **377**(2-3):193-197.
171. Garcha RS, Sever PS, Hughes AD. Mechanism of action of angiotensin II in human isolated subcutaneous resistance arteries. *Br J Pharmacol* 2001; **134**(1):188-196.
172. Chan SH, Hsu KS, Huang CC, Wang LL, Ou CC, Chan JY. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res* 2005; **97**(8):772-780.
173. Kim J, Lee YR, Lee CH, Choi WH, Lee CK, Kim J, et al. Mitogen-activated protein kinase contributes to elevated basal tone in aortic smooth muscle from hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2005; **514**(2-3):209-215.
174. Muthalif MM, Karzoun NA, Gaber L, Khandekar Z, Benter IF, Saeed AE, et al. Angiotensin II-induced hypertension: contribution of Ras GTPase/Mitogen-activated protein kinase and cytochrome P450 metabolites. *Hypertension* 2000; **36**(4):604-609.
175. Boer RA, Pokharel S, Flesch M, van Kampen DA, Suurmeijer AJ, Boomsma F, et al. Extracellular signal regulated kinase and SMAD signaling both mediate the angiotensin II driven progression towards overt heart failure in homozygous TGR(mRen2)27. *J Mol Med* 2004; **82**(10):678-687.
176. Sano M, Fukuda K, Sato T, Kawaguchi H, Suematsu M, Matsuda S, et al. ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res* 2001; **89**(8):661-669.
177. Takahashi H, Takeishi Y, Miyamoto T, Shishido T, Arimoto T, Konta T, et al. Protein kinase C and extracellular signal regulated kinase are involved in

cardiac hypertrophy of rats with progressive renal injury. *Eur J Clin Invest* 2004; **34**(2):85-93.

178. Kagiya S, Qian K, Kagiya T, Phillips MI. Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 2003; **41**(3 Pt 2):824-829.
179. Kagiya S, Eguchi S, Frank GD, Inagami T, Zhang YC, Phillips MI. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation* 2002; **106**(8):909-912.
180. Takahashi H, Takeishi Y, Arimoto T, Shishido T, Konta T, Koyama Y, et al. Pitavastatin inhibits cardiac hypertrophy in a rat model of progressive renal injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; **46**(4):487-493.
181. Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Glassman M, Che W, Lee JD, et al. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**(9):1637-1648.
182. Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P. Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord* 2004; **4**:6.
183. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, et al. Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension* 2002; **39**(1):16-21.
184. Flamant M, Tharaux PL, Placier S, Henrion D, Coffman T, Chatziantoniou C, et al. Epidermal growth factor receptor trans-activation mediates the tonic and fibrogenic effects of endothelin in the aortic wall of transgenic mice. *FASEB J* 2003; **17**(2):327-329.
185. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, Miyata K, Yoshizumi M, Kagami S, et al. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension* 2004; **43**(4):841-848.
186. Imai G, Satoh T, Kumai T, Murao M, Tsuchida H, Shima Y, et al. Hypertension accelerates diabetic nephropathy in Wistar fatty rats, a model of type 2 diabetes mellitus, via mitogen-activated protein kinase cascades and transforming growth factor-beta1. *Hypertens Res* 2003; **26**(4):339-347.
187. de Borst MH, Navis G, de Boer RA, Huitema S, Vis LM, van Gilst WH, et al. Specific MAP-kinase blockade protects against renal damage in homozygous TGR(mRen2)27 rats. *Lab Invest* 2003; **83**(12):1761-1770.

188. Sebolt-Leopold JS. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 2000; **19**(56):6594-6599.
189. Lavoisier AL. De la combinaison des acides avec les bases salifiables, et de la formation des sels neutres. In: Cuchet (editor): *Traité élémentaire de chimie, présenté dans un ordre nouveau et d'après les découvertes récentes, avec Figures*. Paris; 1789.
190. Les Progrès de la Chimie Organique dans la première moitié du XIX^e siècle. <http://histoirechimie.free.fr/somframe.htm> . 2006.
191. Gomberg M. "triphenylmethyl, a case of trivalence for the carbon". *J.Am.Chem.Soc.* 22, 757-771. 1900.
192. Fenton HJH. The oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J.Chem.Soc., Proc.* 10, 157-158. 1894.
193. Haber F, Willstätter R. Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktion-Mechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge. *Chem.Ber.*, 64, 2844-2854. 1931.
194. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc* 1934; **147**:332-351.
195. Harman D. Role of free radicals in mutation, cancer, aging, and the maintenance of life. *Radiat Res* 1962; **16**:753-763.
196. Beauchamp C, Fridovich I. A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970; **245**(18):4641-4646.
197. McNaught A, Wilkinson A. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Cambridge, UK.; 1997.
198. Curnutte JT, Whitten DM, Babior BM. Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 1974; **290**(11):593-597.
199. Zentilin L, Tafuro S, Grassi G, Garcia R, Ventura A, Baralle F, et al. Functional reconstitution of oxidase activity in X-linked chronic granulomatous disease by retrovirus-mediated gene transfer. *Exp Cell Res* 1996; **225**(2):257-267.
200. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; **334**(18):1150-1155.

201. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep* 2001; **6**(4):229-234.
202. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969; **244**(22):6056-6063.
203. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; **5**(6):834-842.
204. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; **320**(6061):454-456.
205. Gardner PR, Fridovich I. Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *J Biol Chem* 1991; **266**(29):19328-19333.
206. Pederson TC, Aust SD. The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1975; **385**(2):232-241.
207. Fridovich I. Editorial: Superoxide radical and the bactericidal action of phagocytes. *N Engl J Med* 1974; **290**(11):624-625.
208. Zimmermann R, Flohe L, Weser U, Hartmann HJ. Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase. *FEBS Lett* 1973; **29**(2):117-120.
209. Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 1974; **42**(1):68-72.
210. Forman HJ, Kennedy JA. Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; **60**(3):1044-1050.
211. Badwey JA, Karnovsky ML. Production of superoxide and hydrogen peroxide by an NADH-oxidase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. Modulation by nucleotides and divalent cations. *J Biol Chem* 1979; **254**(22):11530-11537.
212. Knowles PF, Gibson JF, Pick FM, Bray RC. Electron-spin-resonance evidence for enzymic reduction of oxygen to a free radical, the superoxide ion. *Biochem J* 1969; **111**(1):53-58.
213. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; **267**(34):24173-24176.

214. Debey P, Balny C. Production of superoxide ions in rat liver microsomes. *Biochimie* 1973; **55**(3):329-332.
215. Wu L, de Champlain J. Superoxide anion-induced formation of inositol phosphates involves tyrosine kinase activation in smooth muscle cells from rat mesenteric artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **259**(2):239-243.
216. Singh D, Greenwald JE, Bianchine J, Metz EN, Sagone AL, Jr. Evidence for the generation of hydroxyl radical during arachidonic acid metabolism by human platelets. *Am J Hematol* 1981; **11**(3):233-240.
217. Kasazaki K, Yasukawa K, Sano H, Utsumi H. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in NH₄OH-induced gastric lesions of rats using a 300 MHz in vivo ESR technique. *Free Radic Res* 2003; **37**(7):757-766.
218. Krieger-Brauer HI, Kather H. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* 1992; **89**(3):1006-1013.
219. Schubert J, Wilmer JW. Does hydrogen peroxide exist "free" in biological systems? *Free Radic Biol Med* 1991; **11**(6):545-555.
220. Yang ZW, Zheng T, Zhang A, Altura BT, Altura BM. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1998; **344**(2-3):169-181.
221. Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salaices M, Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* 1998; **125**(6):1329-1335.
222. Sotnikova R. Investigation of the mechanisms underlying H₂O₂-evoked contraction in the isolated rat aorta. *Gen Pharmacol* 1998; **31**(1):115-119.
223. Favero TG, Zable AC, Abramson JJ. Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995; **270**(43):25557-25563.
224. Roychoudhury S, Ghosh SK, Chakraborti T, Chakraborti S. Role of hydroxyl radical in the oxidant H₂O₂-mediated Ca²⁺ release from pulmonary smooth muscle mitochondria. *Mol Cell Biochem* 1996; **159**(2):95-103.
225. Ardanaz N, Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; **231**(3):237-251.

226. Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens* 2005; **23**(3):571-579.
227. Zembowicz A, Hatchett RJ, Jakubowski AM, Gryglewski RJ. Involvement of nitric oxide in the endothelium-dependent relaxation induced by hydrogen peroxide in the rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 1993; **110**(1):151-158.
228. Burke TM, Wolin MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol* 1987; **252**(4 Pt 2):H721-H732.
229. Gao YJ, Hirota S, Zhang DW, Janssen LJ, Lee RM. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 2003; **138**(6):1085-1092.
230. Li WG, Miller FJ, Jr., Zhang HJ, Spitz DR, Oberley LW, Weintraub NL. H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem* 2001; **276**(31):29251-29256.
231. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002; **91**(5):406-413.
232. Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977; **78**:67-82.
233. Nohl H, Breuninger V, Hegner D. Influence of mitochondrial radical formation on energy-linked respiration. *Eur J Biochem* 1978; **90**(2):385-390.
234. Otani H, Tanaka H, Inoue T, Umemoto M, Omoto K, Tanaka K, et al. In vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury. *Circ Res* 1984; **55**(2):168-175.
235. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997; **17**(1):3-8.
236. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; **134**(3):707-716.
237. Turrens JF, Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1982; **217**(2):411-421.

238. Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1982; **217**(2):401-410.
239. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977; **180**(2):248-257.
240. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 1999; **31**(4):347-366.
241. Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, et al. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **959**:199-213.
242. Simoneau JA, Colberg SR, Thaete FL, Kelley DE. Skeletal muscle glycolytic and oxidative enzyme capacities are determinants of insulin sensitivity and muscle composition in obese women. *FASEB J* 1995; **9**(2):273-278.
243. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; **404**(6779):787-790.
244. Midaoui AE, Elimadi A, Wu L, Haddad PS, de CJ. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens* 2003; **16**(3):173-179.
245. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 2004; **53 Suppl 1**:S110-S118.
246. Zhou L, Nilsson A. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J Lipid Res* 2001; **42**(10):1521-1542.
247. Vane SJ. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. *Thorax* 2000; **55 Suppl 2**:S3-S9.
248. Dreser H. Pharmacologisches über Aspirin (Acetylsalicylsäure). *Pflüger's Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 76, 306-318. 1899.
Ref Type: Magazine Article
249. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; **231**(25):232-235.

250. Rosen GD, Birkenmeier TM, Raz A, Holtzman MJ. Identification of a cyclooxygenase-related gene and its potential role in prostaglandin formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **164**(3):1358-1365.
251. Raz A, Wyche A, Needleman P. Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(5):1657-1661.
252. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990; **265**(28):16737-16740.
253. Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(4):1178-1182.
254. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature* 1994; **367**(6460):243-249.
255. Fischer S, Weber PC. Prostaglandin I₃ is formed in vivo in man after dietary eicosapentaenoic acid. *Nature* 1984; **307**(5947):165-168.
256. Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J, III, Spur BW, et al. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med* 1985; **312**(19):1217-1224.
257. Knapp HR, Reilly IA, Alessandrini P, FitzGerald GA. In vivo indexes of platelet and vascular function during fish-oil administration in patients with atherosclerosis. *N Engl J Med* 1986; **314**(15):937-942.
258. DeCaterina R, Giannessi D, Mazzone A, Bernini W, Lazzerini G, Maffei S, et al. Vascular prostacyclin is increased in patients ingesting omega-3 polyunsaturated fatty acids before coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 1990; **82**(2):428-438.
259. Whittle BJ, Steel G, Wallace JL. Assessment of the actions of prostanoids in the protection and repair of the gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986; **125**:128-135.
260. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(25):12013-12017.
261. Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2002; **105**(3):387-392.

262. Wu R, Laplante MA, de Champlain J. Prevention of angiotensin II-induced hypertension, cardiovascular hypertrophy and oxidative stress by acetylsalicylic acid in rats. *J Hypertens* 2004; **22**(4):793-801.
263. El Midaoui A., Wu R, de Champlain J. Prevention of hypertension, hyperglycemia and vascular oxidative stress by aspirin treatment in chronically glucose-fed rats. *J Hypertens* 2002; **20**(7):1407-1412.
264. Young W, Mahboubi K, Haider A, Li I, Ferreri NR. Cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor-alpha- and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; **86**(8):906-914.
265. Wu R, Laplante MA, de Champlain J. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* 2005; **45**(6):1139-1144.
266. Ward PA, Sulavik MC, Johnson KJ. Rat neutrophil activation and effects of lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *Am J Pathol* 1984; **116**(2):223-233.
267. Hoffman M, Autor AP. Effect of cyclooxygenase inhibitors and protease inhibitors on phorbol-induced stimulation of oxygen consumption and superoxide production by rat pulmonary macrophages. *Biochem Pharmacol* 1982; **31**(5):775-780.
268. Sawada M, Carlson JC. Superoxide radical production in plasma membrane samples from regressing rat corpora lutea. *Can J Physiol Pharmacol* 1989; **67**(5):465-471.
269. Wu S, Tamaki N, Nagashima T, Yamaguchi M. Reactive oxygen species in reoxygenation injury of rat brain capillary endothelial cells. *Neurosurgery* 1998; **43**(3):577-583.
270. Carey PD, Jenkins JK, Byrne K, Walsh CJ, Fowler AA, Sugerman HJ. The neutrophil respiratory burst and tissue injury in septic acute lung injury: the effect of cyclooxygenase inhibition in swine. *Surgery* 1992; **112**(1):45-55.
271. Armstead WM. Vasopressin induced cyclooxygenase dependent superoxide generation contributes to K(+) channel function impairment after brain injury. *Brain Res* 2001; **910**(1-2):19-28.
272. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 1994; **23**(2):229-235.
273. Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 1999; **274**(34):23679-23682.

274. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; **220**(4597):568-575.
275. Felberg W, Kellaway CH. *Liberation of histamine and formation of lyscithin-like substances by cobra venom*. *J Physiol* 94, 187-226. 1938.
276. Murphy RC, Hammarstrom S, Samuelsson B. Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**(9):4275-4279.
277. Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**(17):5335-5339.
278. Fierro IM, Serhan CN. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res* 2001; **34**(5):555-566.
279. Chavis C, Godard P, Crastes de PA, Damon M. Formation of lipoxins and leukotrienes by human alveolar macrophages incubated with 15(S)-HETE: a model for cellular cooperation between macrophages and airway epithelial cells. *Eicosanoids* 1992; **5**(3-4):203-211.
280. Levy BD, Romano M, Chapman HA, Reilly JJ, Drazen J, Serhan CN. Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J Clin Invest* 1993; **92**(3):1572-1579.
281. Vachier I, Chanez P, Bonnans C, Godard P, Bousquet J, Chavis C. Endogenous anti-inflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **290**(1):219-224.
282. Colgan SP, Serhan CN, Parkos CA, Ip-Archer C, Madara JL. Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1993; **92**(1):75-82.
283. Brezinski DA, Nesto RW, Serhan CN. Angioplasty triggers intracoronary leukotrienes and lipoxin A4. Impact of aspirin therapy. *Circulation* 1992; **86**(1):56-63.
284. Claria J, Serhan CN. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(21):9475-9479.
285. Funk CD. The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1304**(1):65-84.

286. Sigal E. The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am J Physiol* 1991; **260**(2 Pt 1):L13-L28.
287. Li Q, Cheon YP, Kannan A, Shanker S, Bagchi IC, Bagchi MK. A novel pathway involving progesterone receptor, 12/15-lipoxygenase-derived eicosanoids, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates implantation in mice. *J Biol Chem* 2004; **279**(12):11570-11581.
288. Bolick DT, Orr AW, Whetzel A, Srinivasan S, Hatley ME, Schwartz MA, et al. 12/15-lipoxygenase regulates intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to endothelium through activation of RhoA and nuclear factor-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**(11):2301-2307.
289. Yiu SS, Zhao X, Inscho EW, Imig JD. 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid participates in angiotensin II afferent arteriolar vasoconstriction by activating L-type calcium channels. *J Lipid Res* 2003; **44**(12):2391-2399.
290. Natarajan R, Reddy MA, Malik KU, Fatima S, Khan BV. Signaling mechanisms of nuclear factor-kappaB-mediated activation of inflammatory genes by 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid in cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**(9):1408-1413.
291. Natarajan R, Gu JL, Rossi J, Gonzales N, Lanting L, Xu L, et al. Elevated glucose and angiotensin II increase 12-lipoxygenase activity and expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**(11):4947-4951.
292. Woo CH, Eom YW, Yoo MH, You HJ, Han HJ, Song WK, et al. Tumor necrosis factor-alpha generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A2-linked cascade. *J Biol Chem* 2000; **275**(41):32357-32362.
293. Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer B. 5-Lipoxygenase is involved in the angiotensin II-induced NAD(P)H-oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **308**(3):668-672.
294. Jahn B, Hansch GM. Oxygen radical generation in human platelets: dependence on 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; **93**(1):73-79.
295. Zhao L, Funk CD. Lipoxygenase pathways in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2004; **14**(5):191-195.
296. Natarajan R, Nadler JL. Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**(9):1542-1548.

297. George J, Afek A, Shaish A, Levkovitz H, Bloom N, Cyrus T, et al. 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2001; **104**(14):1646-1650.
298. Zhao L, Cuff CA, Moss E, Wille U, Cyrus T, Klein EA, et al. Selective interleukin-12 synthesis defect in 12/15-lipoxygenase-deficient macrophages associated with reduced atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 2002; **277**(38):35350-35356.
299. Cyrus T, Pratico D, Zhao L, Witztum JL, Rader DJ, Rokach J, et al. Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation* 2001; **103**(18):2277-2282.
300. Folcik VA, Nivar-Aristy RA, Krajewski LP, Cathcart MK. Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1995; **96**(1):504-510.
301. Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Glass CK, Sigal E, Witztum JL, et al. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**(18):6959-6963.
302. Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, et al. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**(9):2100-2105.
303. Reilly KB, Srinivasan S, Hatley ME, Patricia MK, Lannigan J, Bolick DT, et al. 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem* 2004; **279**(10):9440-9450.
304. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilisation, purification and properties. *J Biol Chem* 1964; **239**:2379-2385.
305. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; **239**:2370-2378.
306. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 1991; **10**(1):1-14.
307. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; **6**(1):1-42.

308. Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res* 2000; **41**(2):163-181.
309. Di Augustine RP, Fouts JR. The effects of unsaturated fatty acids on hepatic microsomal drug metabolism and cytochrome P-450. *Biochem J* 1969; **115**(3):547-554.
310. Capdevila J, Parkhill L, Chacos N, Okita R, Masters BS, Estabrook RW. The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; **101**(4):1357-1363.
311. Makita K, Falck JR, Capdevila JH. Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *FASEB J* 1996; **10**(13):1456-1463.
312. Henrich WL, Falck JR, Campbell WB. Inhibition of renin release by 14,15-epoxyeicosatrienoic acid in renal cortical slices. *Am J Physiol* 1990; **258**(2 Pt 1):E269-E274.
313. Nguyen X, Wang MH, Reddy KM, Falck JR, Schwartzman ML. Kinetic profile of the rat CYP4A isoforms: arachidonic acid metabolism and isoform-specific inhibitors. *Am J Physiol* 1999; **276**(6 Pt 2):R1691-R1700.
314. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res* 2001; **88**(1):44-51.
315. Thum T, Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet* 2000; **355**(9208):979-983.
316. Zeldin DC, DuBois RN, Falck JR, Capdevila JH. Molecular cloning, expression and characterization of an endogenous human cytochrome P450 arachidonic acid epoxidase isoform. *Arch Biochem Biophys* 1995; **322**(1):76-86.
317. Zeldin DC, Moomaw CR, Jesse N, Tomer KB, Beetham J, Hammock BD, et al. Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxidase pathway. *Arch Biochem Biophys* 1996; **330**(1):87-96.
318. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; **105**(8):1067-1075.

319. McGiff JC, Carroll MA. Cytochrome P450-dependent arachidonate metabolites, renal function and blood pressure regulation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991; **21B**:675-682.
320. Su P, Kaushal KM, Kroetz DL. Inhibition of renal arachidonic acid omega-hydroxylase activity with ABT reduces blood pressure in the SHR. *Am J Physiol* 1998; **275**(2 Pt 2):R426-R438.
321. Wang MH, Guan H, Nguyen X, Zand BA, Nasjletti A, Laniado-Schwartzman M. Contribution of cytochrome P-450 4A1 and 4A2 to vascular 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis in rat kidneys. *Am J Physiol* 1999; **276**(2 Pt 2):F246-F253.
322. Gottlieb RA. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys* 2003; **420**(2):262-267.
323. He H, Chen M, Scheffler NK, Gibson BW, Spremulli LL, Gottlieb RA. Phosphorylation of mitochondrial elongation factor Tu in ischemic myocardium: basis for chloramphenicol-mediated cardioprotection. *Circ Res* 2001; **89**(5):461-467.
324. Caro AA, Cederbaum AI. Role of calcium and calcium-activated proteases in CYP2E1-dependent toxicity in HEPG2 cells. *J Biol Chem* 2002; **277**(1):104-113.
325. Maier KG, Roman RJ. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; **10**(1):81-87.
326. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; **6**(12):3051-3064.
327. Koide M, Kawahara Y, Tsuda T, Yokoyama M. Cytokine-induced expression of an inducible type of nitric oxide synthase gene in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1993; **318**(3):213-217.
328. Hakim TS, Sugimori K, Camporesi EM, Anderson G. Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiol Meas* 1996; **17**(4):267-277.
329. Rimar S, Gillis CN. Selective pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide is due to hemoglobin inactivation. *Circulation* 1993; **88**(6):2884-2887.
330. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; **300**(2):535-543.
331. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial

injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**(4):1620-1624.

332. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; **266**(7):4244-4250.
333. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; **288**(2):481-487.
334. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; **38**(11):1709-1715.
335. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; **351**(6329):714-718.
336. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 1998; **273**(40):25804-25808.
337. Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; **37**:339-359.
338. Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992; **267**(36):25722-25729.
339. Dixon LJ, Hughes SM, Rooney K, Madden A, Devine A, Leahey W, et al. Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus: role of nitric oxide synthase. *Am J Hypertens* 2005; **18**(6):839-843.
340. Massey V, Harris CM. Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years. *Biochem Soc Trans* 1997; **25**(3):750-755.
341. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002; **33**(6):774-797.
342. Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 1981; **25**(1):67-82.
343. Rouquette M, Page S, Bryant R, Benboubetra M, Stevens CR, Blake DR, et al. Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface

- of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Lett* 1998; **426**(3):397-401.
344. Tan S, Gelman S, Wheat JK, Parks DA. Circulating xanthine oxidase in human ischemia reperfusion. *South Med J* 1995; **88**(4):479-482.
 345. Abadeh S, Case PC, Harrison R. Demonstration of xanthine oxidase in human heart. *Biochem Soc Trans* 1992; **20**(4):346S.
 346. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; **312**(3):159-163.
 347. McCord JM, Roy RS, Schaffer SW. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol* 1985; **5**:183-189.
 348. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985; **17**(2):145-152.
 349. Bakhtiarov ZA. Changes in xanthine oxidase activity in patients with circulatory failure. *Ter Arkh* 1989; **61**(5):68-69.
 350. Ekelund UE, Harrison RW, Shokek O, Thakkar RN, Tunin RS, Senzaki H, et al. Intravenous allopurinol decreases myocardial oxygen consumption and increases mechanical efficiency in dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 1999; **85**(5):437-445.
 351. Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 1993; **14**(6):615-631.
 352. Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest* 1999; **79**(8):967-974.
 353. Kurose I, Granger DN. Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **723**:158-179.
 354. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, III, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997; **30**(1 Pt 1):57-63.
 355. Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger RD, Rosas GO, Kobeissi ZA, et al. Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001; **104**(20):2407-2411.

356. Patriarca P, Cramer R, Marussi M, Rossi F, Romeo D. Mode of activation of granule-bound NADPH oxidase in leucocytes during phagocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1971; **237**(2):335-338.
357. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; **74**(6):1141-1148.
358. Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol* 1995; **268**(6 Pt 2):H2274-H2280.
359. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; **401**(6748):79-82.
360. Schleicher E, Weigert C, Rohrbach H, Nerlich A, Bachmeier B, Friess U. Role of glucoxidation and lipid oxidation in the development of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1043**:343-354.
361. Li Y, Trush MA. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**(2):295-299.
362. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, et al. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001; **88**(9):888-894.
363. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q, Taylor WR, et al. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 1997; **80**(1):45-51.
364. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; **271**(38):23317-23321.
365. Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 2004; **90**(5):491-493.
366. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992; **70**(3):593-599.
367. Hohler B, Holzapfel B, Kummer W. NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 2000; **114**(1):29-37.

368. Munzel T, Hink U, Heitzer T, Meinertz T. Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **874**:386-400.
369. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 2004; **22**(3):535-542.
370. Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, et al. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 2005; **45**(4):773-779.
371. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, et al. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 2003; **107**(7):1053-1058.
372. Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *Am J Hypertens* 2005; **18**(1):81-87.
373. Laplante MA, Wu R, Moreau P, de Champlain J. Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**(5):589-596.
374. Morawietz H, Weber M, Rueckschloss U, Lauer N, Hacker A, Kojda G. Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **285**(5):1130-1135.
375. Chang T, Wang R, Wu L. Methylglyoxal-induced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**(2):286-293.
376. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; **49**(11):1939-1945.
377. Inoguchi T, Nawata H. NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* 2005; **6**(4):495-501.
378. Yoshimoto T, Fukai N, Sato R, Sugiyama T, Ozawa N, Shichiri M, et al. Antioxidant effect of adrenomedullin on angiotensin II-induced reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2004; **145**(7):3331-3337.

379. Vaziri ND, Ni Z. Expression of NOX-I, gp91phox, p47phox and P67phox in the aorta segments above and below coarctation. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1723**(1-3):321-327.
380. Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol* 2004; **165**(1):219-226.
381. Mata-Greenwood E, Grobe A, Kumar S, Noskina Y, Black SM. Cyclic stretch increase VEGF expression in pulmonary arterial smooth muscle cells via TGF- β 1 and reactive oxygen species: a requirement for NAD(P)H oxidase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; **289**(2):L288-289.
382. Hwang J, Saha A, Boo YC, Sorescu GP, McNally JS, Holland SM, et al. Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O₂⁻ from p47phox-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion. *J Biol Chem* 2003; **278**(47):47291-47298.
383. Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**(2):300-305.
384. Wassmann S, Laufs U, Stamenkovic D, Linz W, Stasch JP, Ahlbory K, et al. Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation* 2002; **105**(17):2083-2091.
385. Lo IC, Shih JM, Jiang MJ. Reactive oxygen species and ERK 1/2 mediate monocyte chemotactic protein-1-stimulated smooth muscle cell migration. *J Biomed Sci* 2005; **12**(2):377-388.
386. Laplante MA, Wu R, El Midaoui A, de Champlain J. NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2003; **21**(5):927-936.
387. Tojo A, Onozato ML, Kobayashi N, Goto A, Matsuoka H, Fujita T. Antioxidative effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor in the kidney of hypertensive rat. *J Hypertens* 2005; **23**(1):165-174.
388. Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res* 2003; **93**(8):767-775.
389. Chao J, Chao L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Exp Physiol* 2005; **90**(3):291-298.

390. Park JY, Park KG, Kim HJ, Kang HG, Ahn JD, Kim HS, et al. The effects of the overexpression of recombinant uncoupling protein 2 on proliferation, migration and plasminogen activator inhibitor 1 expression in human vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* 2005; **48**(5):1022-1028.
391. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**(6):981-987.
392. Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, et al. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* 1999; **55**(1):252-260.
393. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2003; **24**(9):471-478.
394. Matsui R, Xu S, Maitland KA, Hayes A, Leopold JA, Handy DE, et al. Glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency decreases the vascular response to angiotensin II. *Circulation* 2005; **112**(2):257-263.
395. Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, et al. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ Res* 2004; **95**(9):937-944.
396. Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, et al. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2004; **61**(1):159-168.
397. Balakrishnan SM, Wang HD, Gopalakrishnan V, Wilson TW, McNeill JR. Effect of an endothelin antagonist on hemodynamic responses to angiotensin II. *Hypertension* 1996; **28**(5):806-809.
398. Wedgwood S, Dettman RW, Black SM. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; **281**(5):L1058-L1067.
399. Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2004; **22**(6):1141-1149.
400. Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **269**(3):713-717.

401. Fei J, Viedt C, Soto U, Elsing C, Jahn L, Kreuzer J. Endothelin-1 and smooth muscle cells: induction of jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**(5):1244-1249.
402. Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, et al. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; **110**(15):2233-2240.
403. Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol* 2005; **145**(3):323-333.
404. Dong F, Zhang X, Ren J. Leptin regulates cardiomyocyte contractile function through endothelin-1 receptor-NADPH oxidase pathway. *Hypertension* 2006; **47**(2):222-229.
405. Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**(1):45-51.
406. Ximenes VF, Silva SO, Rodrigues MR, Catalani LH, Maghzal GJ, Kettle AJ, et al. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2005; **280**(46):38160-38169.
407. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J Bacteriol* 1968; **95**(6):2131-2138.
408. Introduction to lipids peroxidation.
<http://www.cyberlipid.org/perox/oxid0002.htm> . 2006.
409. Porter NA, Wolf RA, Yarbrow EM, Weenen H. The autoxidation of arachidonic acid: formation of the proposed SRS-A intermediate. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; **89**(4):1058-1064.
410. Riely CA, Cohen G, Lieberman M. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science* 1974; **183**(121):208-210.
411. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; **11**(1):81-128.
412. Sugiyama S, Hayakawa M, Nagai S, Ajioka M, Ozawa T. Leukotoxin, 9, 10-epoxy-12-octadecenoate, causes cardiac failure in dogs. *Life Sci* 1987; **40**(3):225-231.

413. Cutler MG, Schneider R. Linoleate oxidation products and cardiovascular lesions. *Atherosclerosis* 1974; **20**(2):383-394.
414. Ramos P, Giese SP, Schuster B, Esterbauer H. Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1995; **36**(10):2113-2128.
415. Davies MJ. Protein oxidation: concepts, mechanisms and new insights. 2003. Ref Type: Personal Communication
416. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; **324** (Pt 1):1-18.
417. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**(11-12):1151-1163.
418. Wu RF, Terada LS. Oxidative modification of protein tyrosine phosphatases. *Sci STKE* 2006; **2006**(332):12.
419. Dafre AL, Reischl E. Hemoglobin S-thiolation during peroxide-induced oxidative stress in chicken blood. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006; **142**(3-4):188-197.
420. Ravichandran V, Seres T, Moriguchi T, Thomas JA, Johnston RB, Jr. S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. *J Biol Chem* 1994; **269**(40):25010-25015.
421. Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Jr., Thomas JA. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys* 1994; **310**(1):273-281.
422. Chai YC, Hendrich S, Thomas JA. Protein S-thiolation in hepatocytes stimulated by t-butyl hydroperoxide, menadione, and neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 1994; **310**(1):264-272.
423. Seres T, Ravichandran V, Moriguchi T, Rokutan K, Thomas JA, Johnston RB, Jr. Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress. *J Immunol* 1996; **156**(5):1973-1980.
424. Fulks RM, Stadtman ER. Regulation of glutamine synthetase, aspartokinase, and total protein turnover in *Klebsiella aerogenes*. *Biochim Biophys Acta* 1985; **843**(3):214-229.

425. Dunn JA, McCance DR, Thorpe SR, Lyons TJ, Baynes JW. Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* 1991; **30**(5):1205-1210.
426. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 1989; **264**(36):21597-21602.
427. Wu L. Is methylglyoxal a causative factor for hypertension development? *Can J Physiol Pharmacol* 2006; **84**(1):129-139.
428. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 1994; **87**(1):21-29.
429. Chang T, Wang R, Wu L. Methylglyoxal-induced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**(2):286-293.
430. Esterbauer H, Puhl H, Eber-Rotheneder M, Waeg G, Rabl H. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann Med* 1991; **23**(5):573-581.
431. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 1983; **221**(1):281-290.
432. Nishikimi M, Machlin LJ. Oxidation of alpha-tocopherol model compound by superoxide anion. *Arch Biochem Biophys* 1975; **170**(2):684-689.
433. Khalil A. [Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin E against atherosclerosis]. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; **80**(7):662-669.
434. Vatassery GT. Oxidation of vitamin E in red cell membranes by fatty acids, hydroperoxides and selected oxidants. *Lipids* 1989; **24**(4):299-304.
435. Tappel AL. Will antioxidant nutrients slow aging processes? *Geriatrics* 1968; **23**(10):97-105.
436. Reddy CC, Scholz RW, Thomas CE, Massaro EJ. Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sci* 1982; **31**(6):571-576.
437. Jones W, Li X, Qu ZC, Perriott L, Whitesell RR, May JM. Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**(1):83-93.

438. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**(24):9748-9752.
439. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(16):6377-6381.
440. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 1990; **264**:155-163.
441. Fleming JE, Bensch KG. Effect of amino acids, peptides and related compounds on the autooxidation of ascorbic acid. *Int J Pept Protein Res* 1983; **22**(3):355-361.
442. Jansson PJ, Jung HR, Lindqvist C, Nordstrom T. Oxidative decomposition of vitamin C in drinking water. *Free Radic Res* 2004; **38**(8):855-860.
443. Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 2002; **105**(3):293-296.
444. Chattopadhyay A, Biswas S, Bandyopadhyay D, Sarkar C, Datta AG. Effect of isoproterenol on lipid peroxidation and antioxidant enzymes of myocardial tissue of mice and protection by quinidine. *Mol Cell Biochem* 2003; **245**(1-2):43-49.
445. D'Alessandro N, Rausa L, Crescimanno M. In vivo effects of doxorubicin and isoproterenol on reduced glutathione and H₂O₂ production in mouse heart. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1988; **62**(1):19-30.
446. Suttorp N, Toepfer W, Roka L. Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase. *Am J Physiol* 1986; **251**(5 Pt 1):C671-C680.
447. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, et al. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; **252**:38-53.
448. Scalley RD, Conner CS. Acetaminophen poisoning: a case report of the use of acetylcysteine. *Am J Hosp Pharm* 1978; **35**(8):964-967.
449. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 1998; **16**(3):291-303.
450. Mak IT, Weglicki WB. Protection by beta-blocking agents against free radical-mediated sarcolemmal lipid peroxidation. *Circ Res* 1988; **63**(1):262-266.

451. Jay D, Cuellar A, Zamorano R, Munoz E, Gleason R. Captopril does not scavenge superoxide: captopril prevents O₂⁻ production by chelating copper. *Arch Biochem Biophys* 1991; **290**(2):463-467.
452. Inukai T, Yoshida N, Wakabayashi S, Inukai Y, Matsutomo R, Takanashi K, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers effectively and directly potentiate superoxide scavenging by polymorphonuclear leukocytes from patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Med Sci* 2005; **329**(5):222-227.
453. Umemoto S, Tanaka M, Kawahara S, Kubo M, Umeji K, Hashimoto R, et al. Calcium antagonist reduces oxidative stress by upregulating Cu/Zn superoxide dismutase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2004; **27**(11):877-885.
454. Watanabe T, Yasunari K, Nakamura M. Antioxidative actions of statins: potential mechanisms for antiatherosclerotic effects. *Mini Rev Med Chem* 2006; **6**(5):505-508.
455. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998; **97**(22):2222-2229.
456. Jha P, Flather M, Lonn E, Farkouh M, Yusuf S. The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann Intern Med* 1995; **123**(11):860-872.
457. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; **347**(9004):781-786.
458. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; **342**(3):154-160.
459. Rexrode KM, Lee IM, Cook NR, Hennekens CH, Buring JE. Baseline characteristics of participants in the Women's Health Study. *J Womens Health Gend Based Med* 2000; **9**(1):19-27.
460. Bang HO, Dyerberg J, Nielsen AB. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet* 1971; **1**(7710):1143-1145.
461. Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res* 1985; **26**(2):194-202.

462. Gerster H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res* 1998; **68**(3):159-173.
463. GISSI-Prevenzione trial. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 1999; **354**(9177):447-455.
464. Oomen CM, Ocke MC, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. alpha-Linolenic acid intake is not beneficially associated with 10-y risk of coronary artery disease incidence: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 2001; **74**(4):457-463.
465. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; **99**(6):779-785.
466. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989; **2**(8666):757-761.
467. Hu FB, Bronner L, Willett WC, Stampfer MJ, Rexrode KM, Albert CM, et al. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA* 2002; **287**(14):1815-1821.
468. Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, et al. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA* 1998; **279**(1):23-28.
469. Lee KW, Blann AD, Lip GY. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on plasma indices of thrombogenesis and inflammation in patients post-myocardial infarction. *Thromb Res* 2005.
470. McLennan PL, Raederstorff D. Diabetes puts myocardial n-3 fatty acid status at risk in the absence of supplementation in the rat. *Lipids* 1999; **34** Suppl:S91-S92.
471. Howe PR. Dietary fats and hypertension. Focus on fish oil. *Ann N Y Acad Sci* 1997; **827**:339-352.
472. Morris MC, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* 1993; **88**(2):523-533.

473. McLennan PL, Abeywardena MY, Charnock JS. Influence of dietary lipids on arrhythmias and infarction after coronary artery ligation in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; **63**(11):1411-1417.
474. Billman GE, Kang JX, Leaf A. Prevention of sudden cardiac death by dietary pure omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Circulation* 1999; **99**(18):2452-2457.
475. Schrepf R, Limmert T, Claus WP, Theisen K, Sellmayer A. Immediate effects of n-3 fatty acid infusion on the induction of sustained ventricular tachycardia. *Lancet* 2004; **363**(9419):1441-1442.
476. Christensen JH, Gustenhoff P, Korup E, Aaroe J, Toft E, Moller J, et al. Effect of fish oil on heart rate variability in survivors of myocardial infarction: a double blind randomised controlled trial. *BMJ* 1996; **312**(7032):677-678.
477. McLennan PL, Abeywardena MY, Charnock JS. A comparison of the long-term effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid dietary supplements and the action of indomethacin upon the mechanical performance and susceptibility of the rat heart to dysrhythmia. *Prostaglandins Leukot Med* 1987; **27**(2-3):183-195.
478. Li Y, Kang JX, Leaf A. Differential effects of various eicosanoids on the production or prevention of arrhythmias in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Prostaglandins* 1997; **54**(2):511-530.
479. McLennan PL, Abeywardena MY, Charnock JS. Reversal of the arrhythmogenic effects of long-term saturated fatty acid intake by dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1990; **51**(1):53-58.
480. McLennan P, Howe P, Abeywardena M, Muggli R, Raederstorff D, Mano M, et al. The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid. *Eur J Pharmacol* 1996; **300**(1-2):83-89.
481. Willumsen N, Vaagenes H, Lie O, Rustan AC, Berge RK. Eicosapentaenoic acid, but not docosahexaenoic acid, increases mitochondrial fatty acid oxidation and upregulates 2,4-dienoyl-CoA reductase gene expression in rats. *Lipids* 1996; **31**(6):579-592.
482. Kang JX, Leaf A. Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**(1 Suppl):202S-207S.
483. Agren JJ, Vaisanen S, Hanninen O, Muller AD, Hornstra G. Hemostatic factors and platelet aggregation after a fish-enriched diet or fish oil or docosahexaenoic acid supplementation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; **57**(4-5):419-421.

484. Mori TA, Beilin LJ, Burke V, Morris J, Ritchie J. Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**(2):279-286.
485. Eritsland J, Arnesen H, Gronseth K, Fjeld NB, Abdelnoor M. Effect of dietary supplementation with n-3 fatty acids on coronary artery bypass graft patency. *Am J Cardiol* 1996; **77**(1):31-36.
486. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* 1989; **320**(5):265-271.
487. Endres S, Meydani SN, Ghorbani R, Schindler R, Dinarello CA. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J Leukoc Biol* 1993; **54**(6):599-603.
488. Endres S, Eisenhut T, Sinha B. n-3 polyunsaturated fatty acids in the regulation of human cytokine synthesis. *Biochem Soc Trans* 1995; **23**(2):277-281.
489. Fox PL, DiCorleto PE. Fish oils inhibit endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein. *Science* 1988; **241**(4864):453-456.
490. De CR, Madonna R, Massaro M. Effects of omega-3 fatty acids on cytokines and adhesion molecules. *Curr Atheroscler Rep* 2004; **6**(6):485-491.
491. De CR, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**(1 Suppl):213S-223S.
492. Bronsgeest-Schoute HC, van Gent CM, Luten JB, Ruiter A. The effect of various intakes of omega 3 fatty acids on the blood lipid composition in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr* 1981; **34**(9):1752-1757.
493. Kim HK, Choi S, Choi H. Suppression of hepatic fatty acid synthase by feeding alpha-linolenic acid rich perilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats. *J Nutr Biochem* 2004; **15**(8):485-492.
494. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997; **65**(5 Suppl):1645S-1654S.
495. Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, et al. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; **361**(9356):477-485.

496. Garriguet D. Vue d'ensemble des habitudes alimentaires des Canadiens. © Ministre de l'Industrie. 2006. Division de la statistique de la santé, Statistique Canada.
497. Holden J. USDA National Nutrient Database.
http://www.ars.usda.gov/main/site_main.htm?modecode=12-35-45-00 . 2006.
498. Din JN, Newby DE, Flapan AD. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-- fishing for a natural treatment. *BMJ* 2004; **328**(7430):30-35.
499. Heller A, Koch T, Schmeck J, van AK. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs* 1998; **55**(4):487-496.
500. McLennan PL, Dallimore JA. Dietary canola oil modifies myocardial fatty acids and inhibits cardiac arrhythmias in rats. *J Nutr* 1995; **125**(4):1003-1009.
501. Weber PC. The modification of the arachidonic acid cascade by n-3 fatty acids. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1990; **20**:232-240.
502. Needleman P, Whitaker MO, Wyche A, Watters K, Sprecher H, Raz A. Manipulation of platelet aggregation by prostaglandins and their fatty acid precursors: pharmacological basis for a therapeutic approach. *Prostaglandins* 1980; **19**(1):165-181.
503. Boudreau MD, Sohn KH, Rhee SH, Lee SW, Hunt JD, Hwang DH. Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acids: mediation through cyclooxygenase-independent pathways. *Cancer Res* 2001; **61**(4):1386-1391.
504. Malkowski MG, Thuresson ED, Lakkides KM, Rieke CJ, Micielli R, Smith WL, et al. Structure of eicosapentaenoic and linoleic acids in the cyclooxygenase site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J Biol Chem* 2001; **276**(40):37547-37555.
505. Obata T, Nagakura T, Masaki T, Maekawa K, Yamashita K. Eicosapentaenoic acid inhibits prostaglandin D2 generation by inhibiting cyclo-oxygenase-2 in cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy* 1999; **29**(8):1129-1135.
506. Dyerberg J, Jorgensen KA. The effect of arachidonic- and eicosapentaenoic acid on the synthesis of prostacyclin-like material in human umbilical vasculature. *Artery* 1980; **8**(1):12-17.
507. Fischer S, Weber PC. Thromboxane (TX)A3 and prostaglandin (PG)I3 are formed in man after dietary eicosapentaenoic acid: identification and quantification by capillary gas chromatography-electron impact mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* 1985; **12**(9):470-476.

508. Swann PG, Parent CA, Croset M, Fonlupt P, Lagarde M, Venton DL, et al. Enrichment of platelet phospholipids with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibits thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor binding and function. *J Biol Chem* 1990; **265**(35):21692-21697.
509. Parent CA, Lagarde M, Venton DL, Le Breton GC. Selective modulation of the human platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor by eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in intact platelets and solubilized platelet membranes. *J Biol Chem* 1992; **267**(10):6541-6547.
510. Yamashita T, Oda E, Sano T, Yamashita T, Ijiru Y, Giddings JC, et al. Varying the ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid alters the tendency to thrombosis and progress of atherosclerosis in apoE^{-/-} LDLR^{-/-} double knockout mouse. *Thromb Res* 2005; **116**(5):393-401.
511. Chen LY, Lawson DL, Mehta JL. Reduction in human neutrophil superoxide anion generation by n-3 polyunsaturated fatty acids: role of cyclooxygenase products and endothelium-derived relaxing factor. *Thromb Res* 1994; **76**(4):317-322.
512. Sarsilmaz M, Songur A, Ozyurt H, Kus I, Ozen OA, Ozyurt B, et al. Potential role of dietary omega-3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; **69**(4):253-259.
513. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001; **15**(12):2073-2084.
514. Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(3):1046-1050.
515. McNally AK, Chisolm GM, III, Morel DW, Cathcart MK. Activated human monocytes oxidize low-density lipoprotein by a lipoxygenase-dependent pathway. *J Immunol* 1990; **145**(1):254-259.
516. Bromberg Y, Pick E. Unsaturated fatty acids as second messengers of superoxide generation by macrophages. *Cell Immunol* 1983; **79**(2):240-252.
517. Vaagenes H, Muna ZA, Madsen L, Berge RK. Low doses of eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and hypolipidemic eicosapentaenoic acid derivatives have no effect on lipid peroxidation in plasma. *Lipids* 1998; **33**(11):1131-1137.
518. Turini ME, Crozier GL, Donnet-Hughes A, Richelle MA. Short-term fish oil supplementation improved innate immunity, but increased ex vivo oxidation of LDL in man--a pilot study. *Eur J Nutr* 2001; **40**(2):56-65.

519. Kesavulu MM, Kameswararao B, Apparao C, Kumar EG, Harinarayan CV. Effect of omega-3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2002; **28**(1):20-26.
520. Roig-Perez S, Guardiola F, Moreto M, Ferrer R. Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine. *J Lipid Res* 2004; **45**(8):1418-1428.
521. Ding WQ, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: the potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. *Mol Cancer Ther* 2004; **3**(9):1109-1117.
522. Kim HJ, Vosseler CA, Weber PC, Erl W. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in proliferating human endothelial cells. *J Cell Physiol* 2005; **204**(3):881-888.
523. Leonardi F, Attorri L, Di BR, Di BA, Sanchez M, Nardini M, et al. Effect of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidative status of C6 glioma cells. *Free Radic Res* 2005; **39**(8):865-874.
524. Weber KT, Janicki JS, Pick R, Abrahams C, Shroff SG, Bashey RI, et al. Collagen in the hypertrophied, pressure-overloaded myocardium. *Circulation* 1987; **75**(1 Pt 2):140-147.
525. Rizzoni D, Porteri E, Guefi D, Piccoli A, Castellano M, Pasini G, et al. Cellular hypertrophy in subcutaneous small arteries of patients with renovascular hypertension. *Hypertension* 2000; **35**(4):931-935.
526. Wu L, de Champlain J. Superoxide anion-induced formation of inositol phosphates involves tyrosine kinase activation in smooth muscle cells from rat mesenteric artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **259**(2):239-243.
527. Godeny MD, Sayeski PP. Ang II-induced cell proliferation is mediated by c-Src/Yes/Fyn-regulated ERK1/2 activation in the cytoplasm and PKC{zeta}-controlled ERK1/2 within the nucleus. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006.
528. Touyz RM. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; **12**(2):165-174.
529. Morisco C, Lembo G, Trimarco B. Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology. *Trends Cardiovasc Med* 2006; **16**(6):183-188.

530. Dobrian AD, Schriver SD, Prewitt RL. Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension* 2001; **38**(3):361-366.
531. Nishiyama A, Kobori H, Fukui T, Zhang GX, Yao L, Rahman M, et al. Role of angiotensin II and reactive oxygen species in cyclosporine A-dependent hypertension. *Hypertension* 2003; **42**(4):754-760.
532. Kimura S, Zhang GX, Nagai Y, Miyata K, Nishiyama A, Shokoji T, et al. Time-dependent transition of tempol-sensitive reduction of blood pressure in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens* 2004; **22**(11):2161-2168.
533. Zimmerman MC, Sharma RV, Davisson RL. Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells. *Hypertension* 2005; **45**(4):717-723.
534. Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; **44**(2):200-208.
535. Kobori H, Nishiyama A. Effects of tempol on renal angiotensinogen production in Dahl salt-sensitive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **315**(3):746-750.
536. Kahler J, Mendel S, Weckmuller J, Orzechowski HD, Mittmann C, Koster R, et al. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J Mol Cell Cardiol* 2000; **32**(8):1429-1437.
537. Kahler J, Ewert A, Weckmuller J, Stobbe S, Mittmann C, Koster R, et al. Oxidative stress increases endothelin-1 synthesis in human coronary artery smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; **38**(1):49-57.
538. Gottlieb RA, Huang C, Paromov V, Tsukada Y, Wentworth P. Role of cytochrome P450 in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc J S Afr* 2004; **15**(4 Suppl 1):S1.
539. Wijendran V, Hayes KC. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr* 2004; **24**:597-615.
540. Faulkner K, Fridovich I. Luminol and lucigenin as detectors for O₂⁻. *Free Radic Biol Med* 1993; **15**(4):447-451.
541. Minkenberg I, Ferber E. Lucigenin-dependent chemiluminescence as a new assay for NAD(P)H-oxidase activity in particulate fractions of human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol Methods* 1984; **71**(1):61-67.

542. Janiszewski M, Souza HP, Liu X, Pedro MA, Zweier JL, Laurindo FR. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. *Free Radic Biol Med* 2002; **32**(5):446-453.
543. Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**(11):1761-1768.
544. Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 1997; **337**(1):115-120.
545. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 2001; **89**(3):224-236.
546. Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mulsch A, Harrison DG, Sindermann I, et al. Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **254**(2):319-324.
547. Barbacanne MA, Souchard JP, Darblade B, Iliou JP, Nepveu F, Pipry B, et al. Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**(5):388-396.
548. Afanas'ev IB, Ostrachovitch EA, Korkina LG. Lucigenin is a mediator of cytochrome C reduction but not of superoxide production. *Arch Biochem Biophys* 1999; **366**(2):267-274.
549. Spasojevic I, Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin: redox potential in aqueous media and redox cycling with O₂⁻ production. *Arch Biochem Biophys* 2000; **373**(2):447-450.
550. Ilan YA, Czapski G, Meisel D. The one-electron transfer redox potentials of free radicals. I. The oxygen/superoxide system. *Biochim Biophys Acta* 1976; **430**(2):209-224.
551. Goto T, Inoue S, Sugiura S, Nishikawa K, Isobe M, Abe Y. Cypridina bioluminescence V. structure of emitting species in the luminescence of cypridina luciferin and its related compounds. *Tetrahedron Lett* 1968; **37**:4035-4038.
552. Guzik TJ, Channon KM. Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence. *Methods Mol Med* 2004; **108**:73-90.

Curriculum vitae

Curriculum vitae

Nom : Marc-André Laplante, M.Sc.

Date de naissance : [REDACTED]

Formation Universitaire

1) Université de Montréal (2002-)
2900, Édouard-Montpetit
Montréal (Qc), tél : (514) 343-6111

Programme : Doctorat en Physiologie

La production de l'anion superoxyde induite par l'angiotensine, l'endothéline et les oméga-6 dans les tissus vasculaires au cours du développement de l'hypertension

2) Université de Montréal (2001- 2002)
2900, Édouard-Montpetit
Montréal (Qc), tél : (514) 343-6111

Programme : Maîtrise en Physiologie

Passage direct au doctorat.

3) Université de Montréal (1997-2000)
2900, Édouard-Montpetit
Montréal (Qc), tél : (514) 343-6111

Programme : Baccalauréat en Biochimie
Diplôme de Baccalauréat en biochimie

ARTICLES/CHAPITRES DE LIVRES

WU R, LAPLANTE M, DE CHAMPLAIN J. L'aspirine, les cyclo-oxygénases et les effets cardiovasculaires délétères de l'angiotensine II. Rôle des cyclo-oxygénases dans les effets de l'angiotensine II. *Médecine Science* 2006 Jan; 1 (22) : 16-17

LAPLANTE M, DE CHAMPLAIN J. The interrelation of the angiotensin and endothelin system on the modulation of NAD(P)H oxidase. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2006, Jan; 84 (1) : 21-28. Revue

WU R, LAPLANTE M, DE CHAMPLAIN J. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* 2005 Jun;45(6):1139-44

LAPLANTE M, WU R, MOREAU P, DE CHAMPLAIN J. Endothelin Mediates Superoxide Production During Sustained Angiotensin II Elevation. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2005 Mar 1;38(5):589-96.

WU R, LAPLANTE M, DE CHAMPLAIN J. Prevention of Angiotensin II-induced Hypertension, Cardiovascular Hypertrophy and Oxidative Stress by Acetylsalicylic Acid in Rats. *Journal of Hypertension*, 2004 Apr;22(4):793-801.

MOREAU P, LAPLANTE M, BEAUCAGE P, DE CHAMPLAIN J. Angiotensin-Endothelin Interactions. In : Unger T, Schölkens BA (editors) : *Handbook of Experimental Pharmacology –Angiotensin*, Section 1 : Gene aspects, vol. 163/I. Berlin : Springer-Verlag; 2004, pp. 149-170.

DE CHAMPLAIN J, WU R, GIROUARD H, KARAS M, EL MIDAOUÏ A, LAPLANTE M, WU L, Oxidative stress in hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 2004 vol 26 no 7, 8 pp593-601.

LAPLANTE M, WU R, EL MIDAOUÏ A, DE CHAMPLAIN J. NAD(P)H Oxidase Activation By Angiotensin II is Dependent on p42/44 ERK-MAPK Pathway Activation in Rat's Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Hypertension*, 2003 Mai;21(5):927-936.

MILETTE E, DEMEILLERS B, WU R, LAPLANTE MA, EL MIDAOUÏ A, MOREAU P, LAMONTAGNE D, DE CHAMPLAIN J. Comparison of the cardiovascular protection by omapatrilat or lisinopril treatments in doca-salt hypertension. *J Hypertens*. 2003 Jan;21(1):125-35.

RÉSUMÉS/PRÉSENTATIONS

LAPLANTE MA, WU R, MOUGHARBEL Z, WANG J, DE CHAMPLAIN J. The Effects of Omega-3 and Omega-6 Free fatty Acids on the Production of Superoxide Anion in Aortas and Cultured Vascular Smooth Muscles Cells from Rats. Vancouver, October 23 2006, oral presentation, the abstract is currently accepted.

LAPLANTE MA, WU R, MOUGHARBEL Z, WANG J, DE CHAMPLAIN J. The effects of omega-3 and 6 free fatty acids on the production of vascular superoxide anion and blood pressure of rats. *International society of hypertension*. Fukuoka, October 16 2006, oral presentation, the abstract is currently accepted.

LAPLANTE MA, WU R, MOUGHARBEL Z, WANG J, DE CHAMPLAIN J. The effects of omega-3 and 6 free fatty acids on the production of superoxide anion in vascular smooth muscles cells from rats. *European Society of Hypertension Annual Congress*. Madrid, June 13-15 2006. Présentation par affiche. Citation: *Journal of Hypertension* Volume 24, Supplement 4, June 2006, page S404

WU R, LAPLANTE MA, DE CHAMPLAIN J. The antioxydative and the cardioprotective effects of aspirin could result from an inhibition of the cyclooxygenase-2 pathway. *European Society of Hypertension Annual Congress*. Madrid, June 13-15 2006. Présentation par affiche. Citation: *Journal of Hypertension* Volume 24, Supplement 4, June 2006, page 338

LAPLANTE MA, WU R, DE CHAMPLAIN J. The role of cyclooxygenase-2 in angiotensin II-induced hypertension and production of oxidative stress in mice. Eumorphia 3rd annual meeting, Symposium: Insights of mice transgenesis in cardiovascular research: from bench to bedside. Oral presentation. Barcelona, Spain, 23-24 February 2006.

DE CHAMPLAIN J, WU R, WU L, GIROUARD H, EL MIDAOUÏ A, LAPLANTE MA. The contribution of oxidative stress in the developement of hypertension and diabetes. *1st health and nutrition international congress*, Dijon, France, 2-4 March 2006.

LAPLANTE M., WU R., DE CHAMPLAIN, J. Effet d'un oméga-3 sur la production de l'anion superoxyde induite par un oméga-6 dans les cellules de muscles lisses vasculaires. Présentation par affiche. 14^e Réunion annuelle, Société québécoise d'hypertension artérielle, Janvier 2006, *Médecine Science*, Volume 22 suppl. 1.

WU, R., LAPLANTE M., DE CHAMPLAIN, J. L'hypertension et le stress oxydant induits par l'angiotensine II sont dépendant de l'activation de la cyclo-oxygénase-2. Présentation par affiche. 14^e Réunion annuelle, Société québécoise d'hypertension artérielle, Janvier 2006, *Médecine Science*, Volume 22 suppl. 1.

WU, R., LAPLANTE, M., DE CHAMPLAIN, J. Implication of cyclooxygenase-2 pathway in the angiotensin II-induced oxidative stress in the heart. Présentation par affiche. *Canadian Cardiovascular Congress*, Montréal, Octobre 2005. Citation: *Can J Cardiol*, Vol. 21 Suppl C Octobre 2005 page 41C

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. The ERK1/2 pathway is involved in the superoxide anion production by angiotensin II but not by endothelin-1 in rat's vascular smooth muscle and endothelial cells. Présentation par affiche. *Canadian Cardiovascular Congress*, Montréal, Octobre 2005. Citation: *Can J Cardiol*, Vol. 21 Suppl C Octobre 2005 page 41C

WU, R., LAPLANTE, M., DE CHAMPLAIN, J. Role of cyclooxygenase-2 pathway in angiotensin II-induced hypertension and oxidative stress in rats. *European Society of Hypertension Annual Congress*. Milan, June 2005. Citation: *Journal of Hypertension* Volume 23, Supplement 2, June 2005, page S272

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. The superoxide production stimulated by endothelin-1 is independent of the ERK1/2 pathway in rat's vascular smooth muscle and endothelial cells. Présentation par affiche. *European Society of Hypertension Annual Congress*. Milan, June 2005. Citation: *Journal of Hypertension* Volume 23, Supplement 2, June 2005, page S249

MONASSIER, L., LAPLANTE, M., JAFFÉ, F., BOUSQUET, P., MAROTEAU, L. & DE CHAMPLAIN, J. Reduction of myocardial oxidative stress by serotonergic 5-HT_{2B} receptor blockade: a role in the prevention of cardiac hypertrophy due to isoproterenol and angiotensin II. *Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire* 20-22 avril 2005, Strasbourg.

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. The NAD(P)H oxidase activity is stimulated by endothelin-1 through an ERK1/2-Independent mechanism in rat's vascular smooth muscle and endothelial cells. Présentation orale. *Congress of Young Investigators*, Winnipeg, 30 April 2005. *Experimental and Clinical Cardiology* 2005 vol. 10; 1 p.35.

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. La production de O₂⁻ stimulée par l'endothéline est indépendante de la voie ERK-MAPK dans les cellules de muscles lisses et endothéliales. Présentation par affiche. 13^e Réunion annuelle, Société québécoise d'hypertension artérielle, Janvier 2005, *Médecine Science*, Volume 21 suppl. 1.

WU, R., LAPLANTE, M., DE CHAMPLAIN, J. Rôle de l'activation du Nf-kB et de l'inflammation chronique dans le stress oxydatif, l'hypertension et l'hypertrophie cardiaque induits par l'angiotensine II (ANG II) chez les rats Sprague-Dawley. Société québécoise d'hypertension artérielle, Janvier 2005, *Médecine Science*, Volume 21 suppl. 1.

EL MIDAOU, A., LAPLANTE, MA., DE CHAMPLAIN, J. L'acide alpha-lipoïque prévient l'augmentation de la phosphorylation Ser/Thr de l'IRS-1 et de la production de l'anion superoxyde au niveau des cellules musculaires lisses aortiques stimulées par l'insuline. 13^e Réunion annuelle, Société québécoise d'hypertension artérielle, Janvier 2005, *Médecine Science*, Volume 21 suppl. 1.

EL MIDAOU, A., LAPLANTE, MA., DE CHAMPLAIN, J. Alpha-lipoic acid prevented the increase in Ser/Thr phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and superoxide anion production in insulin stimulated aortic smooth muscle cells. *Canadian Hypertension Society*. Calgary, octobre 2004.

LAPLANTE, M., WU, R., MOREAU, P., DE CHAMPLAIN, J. The Angiotensin II-induced Endothelin-1 Production In Vascular Smooth Muscle Cells Is Important For The Sustained Superoxide Anion Production. Présentation par affiche. *Canadian Hypertension Society*. Calgary, octobre 2004. *Canadian Journal of Cardiology*, vol 20 Suppl. D. p.61D.

WU, R., LAPLANTE, M., DE CHAMPLAIN, J. Role of Nf-kB; Activation and chronic inflammation in angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension and cardiac hypertrophy. *Canadian Hypertension Society*. Calgary, octobre 2004.

LAPLANTE, M., WU, R., MOREAU, P., DE CHAMPLAIN, J. Role of Endothelin in the Stimulation of NAD(P)H Oxidase by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells and Isolated Aorta. Poster presentation, *Congress of Young Investigators*, Winnipeg, May 2004. *Experimental and Clinical Cardiology 2004 Volume 9, number 1, p.61.*

LAPLANTE, M., WU, R., MOREAU, P., DE CHAMPLAIN, J. The Role of Endothelin in the Long Term Stimulation of NAD(P)H Oxidase by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. Présentation par affiche. *International Society of Hypertension*. Sao Paulo, February 2004. *Journal of Hypertension Volume 22 Supplement 1*

WU, R., LAPLANTE, M., DE CHAMPLAIN, J. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension and cardiac hypertrophy in rats. *International Society of Hypertension*. Sao Paulo, February 2004. *Journal of Hypertension Volume 22 Supplement 1*

LAPLANTE, M., WU, R., MOREAU, P., DE CHAMPLAIN, J. L'Endothéline-1 Joue un Rôle Essentiel dans la Production à Long Terme de l'Anion Superoxyde par l'Angiotensine II dans les Cellules de Muscles Lisses Vasculaires. Présentation par affiche. *Congrès annuel de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle*, Montréal, Janvier 2004. *Médecine Science*, Volume 20 numéro 1 suppl. 1.

LAPLANTE, M., WU, R., MOREAU, P., DE CHAMPLAIN, J. Involvement of Endothelin in the Stimulation of NAD(P)H Oxidase by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. Présentation orale. *Canadian Hypertension Society*. Toronto, octobre 2003. *Canadian Journal of Cardiology*. October 2003, Volume 19 Supplement A, 357.

LAPLANTE, M., WU, R., MOREAU, P., DE CHAMPLAIN, J. Role of endothelin in the stimulation of NAD(P)H oxidase and superoxide production in vascular smooth muscle cells following a treatment with angiotensin II. Présentation par affiche. *European Society of Hypertension Annual Congress*. Milan, 13-17 juin 2003.

WU, R., LAPLANTE, M., DE CHAMPLAIN, J. The preventive effect of aspirin against angiotensin II induced oxidative stress is independent from cyclooxygenases inhibition. *European Society of Hypertension Annual Congress*. Milan, 13-17 juin 2003.

EL MIDAOU, A., LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. Effects of Alpha-lipoic acid on hypertension, insulin resistance and oxidative stress in chronically glucose-fed rats and angiotensin-treated rats. VIATRIS Scientific Forum, Preclinical Expert Meeting AVE 0001, New York 21 June 2003, USA.

LAPLANTE M., WU R., MOREAU P., DE CHAMPLAIN J. Rôle de l'endothéline dans la stimulation de la NAD(P)H oxydase et la production de l'anion superoxyde dans les cellules de muscle lisses vasculaires suite à un traitement à l'angiotensine II. Présentation par affiche. *Congrès annuel de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle*, Québec, Janvier 2003

LAPLANTE M., WU R., MOREAU P., DE CHAMPLAIN J. Rôle de l'endothéline dans la stimulation de la NAD(P)H oxydase dans les cellules de muscle lisses vasculaires suite à un traitement à l'angiotensine II. Présentation orale. *Congrès annuel des étudiants du GRSNA*. Montréal, 9 décembre 2002.

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. PD98059 and lipoic acid can attenuate the effects of angiotensin II on blood pressure and NAD(P)H activity in rats. Présentation par affiche. *Canadian Hypertension Society*. Edmonton, 26-29 octobre 2002

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. Effect of a MEK inhibitor on blood pressure and NAD(P)H oxidase activity in angiotensin II-treated hypertensive rats. Présentation orale. *European/International Society of Hypertension Annual Congress*. Prague, 23-27 juin 2002.

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. Effets des inhibiteurs de voies tyrosines kinases et map kinases sur la pression artérielle de rats hypertendus à l'angiotensine. Présentation par affiche. *Congrès annuel de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle*, Montréal, Québec, Janvier 2002

LAPLANTE M., WU R, DE CHAMPLAIN J. Effets des inhibiteurs de voies tyrosines kinases et map kinases sur la pression artérielle de rats hypertendus à l'angiotensine; implication de la production de l'anion superoxyde. Présentation par affiche, *XXIes Journées de l'Hypertension Artérielle*. Paris, 13-14 décembre 2001

LAPLANTE M., WU R, DE CHAMPLAIN J. Relationship between arterial blood pressure, superoxide anion and tyrosine kinase pathway in angiotensin-treated hypertensive rats. Présentation orale, *Canadian Hypertension Society*. Halifax, 19-23 octobre 2001

LAPLANTE M., WU R, DE CHAMPLAIN J. Hypotensive effect of genistein in angiotensin-treated rats; implication of the erk-mapk pathway and the superoxide anion radical. Présentation par affiche. *Eleventh European Meeting on Hypertension*. Milan, Italie, 17 juin 2001

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. Hypotensive effect of genistein in angiotensin-treated hypertensive rats; implication of the ERK-MAPK pathway and the superoxyde anion radical. Présentation orale. *American society of Hypertension Sixteenth Annual Scientific Meeting*, San Francisco, Cal., May 2001

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. Effet de la génistéine sur la pression artérielle de rats hypertendus; implication de la voie ERK-MAPK et de la production d'anion superoxyde. Présentation par affiche. *Congrès annuel de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle*, Sainte-Foy, Québec, Janvier 2001

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. Effet de la génistéine sur la pression artérielle de rats hypertendus; implication de la voie ERK-MAPK et de la production d'anion superoxyde. Présentation orale. *Congrès des stagiaires d'été de la Faculté de Médecine*, Montréal, Québec, Janvier 2001.

LAPLANTE, M., WU, R., DE CHAMPLAIN, J. Rôle du stress oxydatif et de la voie ERK-MAP kinase dans le développement de l'hypertension induite par l'angiotensine. Présentation orale. *Congrès annuel des étudiants du Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA)*, Montréal, Québec, Décembre 2000.

LAPLANTE, M., AZZI, M., BOUVIER, M. Rôle de l'internalisation du récepteur β_2 -adrénergique dans l'activation de la voie des MAP kinases. Présentation orale. *Congrès des stagiaires d'été de la Faculté de Médecine*, Montréal, Québec, Janvier 2000.

ANNEXE 1**Méthode de mesure de l'anion superoxyde par la lucigénine**

ANNEXE 1 – Méthode de mesure de l'anion superoxyde par la lucigénine

La lucigénine (bis-N-methylacridinium nitrate) (figure 1) est un composé symétrique possédant deux charges positives en solution capable d'émettre de la lumière en présence d'anion superoxyde [540]. Elle est aussi utilisée dans la mesure de l'activité de la NAD(P)H oxydase [541]. Avant sa réaction avec l'anion superoxyde, la lucigénine doit acquérir un électron provenant d'un donneur. Dans l'analyse de tissus, ce donneur est souvent le NADH de la cellule. La présence de hautes concentrations non physiologiques de NADH dans le milieu de mesure affecte d'ailleurs le cycle redox du composé et l'intensité de la lumière émise [542]. Le NAD(P)H ne présente pas cet inconvénient et est d'ailleurs mieux indiqué pour la mesure de l'activité de la NAD(P)H oxydase que le NADH. La théorie proposant que le NADH est le substrat préférentiel de la NAD(P)H oxydase plutôt que le NAD(P)H est remise en doute puisqu'il est possible qu'elle soit basée sur des observations affectées par cet artéfact [542].

La technique est surtout utilisée pour détecter la production d'anion superoxyde extracellulaire dans les tissus vasculaires [543]. La méthode est appréciée à cause de la détection relativement spécifique de l'anion superoxyde et de la faible toxicité du composé pour les cellules.

La lucigénine est sujette à s'autooxyder avec l'oxygène ambiant à fortes concentrations (250 μ M) [544, 545]. Cependant, l'usage de faibles concentrations (5 μ M) prévient en majeure partie ce phénomène [543, 546] bien que certaines observations tendent à montrer que le problème demeure en partie [542, 547]. Toutefois, la question concernant

ANNEXE 2

Permissions des éditeurs et des auteurs

Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Marc-André Laplante

Docteurat en physiologie

2. Description de l'article

Marc-André Laplante, Rong Wu, Adil El Midaoui, Jacques de Champlain

NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells.

J Hypertens. 2005 May; 23(5):927-36.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Marc-André Laplante** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre *La production de l'anion superoxyde par l'angiotensine, l'endothéline et les voies de signalisation dépendantes de l'adouc myocontractile dans les tissus vasculaires dans le développement de l'hypertension*.

Rong Wu
Coauteur, Signature, Date

18/09/2006

Adil El Midaoui
Coauteur, Signature, Date

15 septembre 2006

Jacques de Champlain
Coauteur, Signature, Date

18/09/2006

Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Marc-André Laplante

Doctorat en physiologie

2. Description de l'article

Laplante MA, Wu R, Moreau P, de Champlain J.

Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats.

Free Radic Biol Med. 2005 Mar 1;38(5):589-96.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Marc-André Laplante** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre *La production de l'anion superoxyde par l'angiotensine, l'endothéline et les voies de signalisation dépendantes de l'acide arachidonique dans les tissus vasculaires dans le développement de l'hypertension.*

Rong Wu

Coauteur, Signature, Date

18/09/2006

Pierre Moreau

Coauteur, Signature, Date

11/09/2006

Jacques de Champlain

Coauteur, Signature, Date

18/09/2006

Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Marc André Laplante

Ph.D. in Physiology

2. Description de l'article

Marc-André Laplante, Rong Wu, Zayna Mougharbel, Jennifer Wang, Jacques de Champlain

Role of angiotensin II and angiotensin II type 1 receptors on superoxide production in aortic vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats.

Pharmacological Research 55:1-10, 2007.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

I, the undersigned, the author identified above, I am in agreement for that **Marc-André** is the author of the article titled "Thèse de doctorat qui a pour titre La production de superoxyde dans les cellules musculaires lisses des artères aortiques dans les rats hypertendus spontanément." and that the article is a research article in the field of physiology.

Rong Wu

Co-author, Signature Date

18/09/2006

Zayna Mougharbel

Co-author, Signature Date

Jennifer Wang

Co-author, Signature Date

18/09/2006

Jacques de Champlain

Co-author, Signature Date

18/09/2006

Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Marc-André Laplante

Doctorat en physiologie

2. Description de l'article

Marc-André Laplante, Rong Wu, Zayna Mougharbel, Jennifer Wang, Jacques de Champlain

Role of omega-3 and omega-6 free fatty acids on superoxide production in aortic vascular smooth muscle cells of Sprague-Dawley rats.

Phase finale à soumettre dans J Hypertens.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Marc-André Laplante** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre *La production de l'anion superoxyde par l'angiotensine, l'endothéline et les voies de signalisation dépendantes de l'acide arachidonique dans les tissus vasculaires dans le développement de l'hypertension.*

Rong Wu

Coauteur, Signature, Date

Zayna Mougharbel

Coauteur Signature Date

14 septembre 2006

Jennifer Wang

Coauteur, Signature, Date

Jacques de Champlain

Coauteur, Signature, Date

Authorization from the editors for the inclusion of a manuscript in a PhD thesis

1. Journal information

Journal of Hypertension

Centro di Fisiologia Clinica e Ipertensione

University of Milan

Ospedale Maggiore

Via F. Sforza 35

20122 Milan, Italy

Tel: +39 02 551 80130

Fax: +39 02 551 80350

E-mail: [redacted]@[redacted].[redacted]

[redacted] & Wilkins. All rights reserved.

Published by Lippincott Williams & Wilkins.

2. Editors information

Editor-in-chief: Professor Alberto Zanchetti

3. Manuscript information

Marc-André Laplante, Rong Wu, Adil El Midaoui, Jacques de Champlain

NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells.

J Hypertens. 2003 May;21(5):927-36.

The PhD student **Marc-André Laplante** is authorized to include the mentioned manuscript in his PhD thesis entitled:

La production de l'anion superoxyde par l'angiotensine, l'endothélie et les voies de signalisation dépendantes de l'acide arachidonique dans les tissus vasculaires lors du développement de l'hypertension.

Editor: [redacted] Signature / Date

September 12, 2006

Date: Wed, 13 Sep 2006 10:25:11 +0100

De: "David, Natalie (ELS-OXF)" [REDACTED]

À: [REDACTED]

Objet: RE: Permission to include a manuscript in a PhD thesis

<<...OLE_Obj...>>

Dear Dr Laplante

We hereby grant you permission to reproduce the material detailed below in your thesis at no charge subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.

2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier".

3. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.

4. This permission is granted for non-exclusive world English rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.

5. This includes permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely,

<<...OLE_Obj...>>

Natalie David

Senior Rights Assistant

Your future requests will be handled more quickly if you complete the online form at www.elsevier.com/permissions <<http://www.elsevier.com/permissions>>

-----Original Message-----

From: FRBM

Sent: 12 September 2006 21:04

To: Rights and Permissions (ELS)

Subject: FW: Permission to include a manuscript in a PhD thesis

Dear Rights and Permissions:

Please find a permission request below.

Regards,

Charity Houston
Journal Manager
Free Radical Biology & Medicine

-----Original Message-----

From: Marc André Laplante [mailto:[REDACTED]]
<mailto:[REDACTED]>
Sent: Monday, September 11, 2006 2:14 PM
To: frbm@elsevier.com
Subject: Permission to include a manuscript in a PhD thesis

Dear Editorial Secretariat,

I am currently completing my PhD studies in the Department of Physiology at the Université de Montréal, in Montreal, Canada.

In my thesis, I am including the manuscripts I have published during my PhD years and one of these manuscripts was published in Free Radicals in Biology & Medicine. In order for the University to archive and diffuse this thesis, I need your signature on the form joined with this letter. The form can be returned by fax. (+001 514 343-2257)

The manuscript is entitled:

Marc-André Laplante, Rong Wu, Pierre Moreau, Jacques de Champlain.
Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats.
Free Radic Biol Med. 2005 Mar 1;38(5):589-96

Thank you for your help and please contact me if you have any questions,

Marc-Andre Laplante
PhD student
Universite de Montréal
Departement de Physiologie
C.P. 6128 Succursale Centre-Ville
Montreal, Quebec, Canada, H3C3J7
Tel : +001 514 343-7562
Fax : +001 514 343-2257
Email : [REDACTED]

ANNEXE 3

Réponses aux commentaires des arbitres

Dr Guy Rousseau

J'ai pris plaisir à lire cette excellente thèse dont le français est nettement supérieur à la moyenne. Je n'ai que peu de commentaires à faire si ce n'est que de féliciter l'étudiant pour le travail accompli. Très remarquable travail de synthèse, excellent pour l'enseignement... Félicitations.

Page 5 : reprendre la phrase commençant par En 1956, une étude de Corcoran...

En 1956, une étude de Corcoran et al. [11] a montré que les patients hypertendus traités adéquatement présentaient moins de complications athérosclerotiques et vivaient plus longtemps.

Page 5 para 3 ligne 6 : conscients

Page 6 dernier mot : pas de s

Page 7 ligne 4 : médium

Page 7 ligne 10 : à leur taille et leur position

Page 8 dernière ligne : de ses vaisseaux

Page 14 ligne 4 : inotropique

Page 15 ligne 2 : mais la décharge de ces...

Page 15 ligne 8 : sur les organes ont aussi

Page 18 ligne 1 : développer un peu sur le régime méditerranéen SVP

Le régime méditerranéen, riche en poissons, huile d'olive, fruit, légumes et vin rouge est un exemple pouvant expliquer des différences de la tension artérielle entre les populations.

Page 20 para 2 ligne 13 : diabète

Page 20 para 2 ligne 14 : développé

Page 20 para 3 ligne 1 gaglionniques

Page 21 ligne 3 : dichloroisoprénaline

Page 21 para 2 ligne 4 : périphérique

Page 24 ligne 1 : médicaments

Page 24 para 2 ligne 7 : et au lieu de est

Page 26 ligne 7 : compétition

Page 26 para 1 dernière ligne : il manque un point à la phrase

Page 26 para 3 ligne 1 : extra-rénaux capables

Page 29 ligne 7 : antagonistes

Page 30 para 2 ligne 3 : tissu

Page 32 ligne 1 : Deux récepteurs

Page 35 ligne 5 : reprendre la phrase SVP. Elle est difficile à lire.

Lors de leur absorption par l'intestin, les lipides forment des chylomicrons, particules très riches en triglycérides, qui sont transportés par le réseau lymphatique vers les récepteurs à LDL des muscles ou du foie. La lipoprotéine lipase hydrolyse les triglycérides pour leur utilisation par les tissus ou pour leur stockage par le foie.

Page 37 ligne 9 : sont

Page 37 ligne 10 : déchargés

Page 38 ligne 1 : spumeuses

Page 43 : Donnez l'hypothèse SVP.

La chimie radicalaire reste cependant un domaine concernant surtout l'industrie cosmétique ou chimique, bien qu'en 1962, une hypothèse intéressante est émise sur le rôle des radicaux libres qui, en causant des dommages sur les biomolécules, en particulier l'ADN, seraient responsables des déficiences génétiques associées au vieillissement.

Page 44 para 2 ligne 6 : anions

Page 45 dernière ligne : réactifs

Page 46 ligne 6 : soufre

Page 62 para 2 ligne 3 : tous

Page 62 para 2 ligne 5 : stimulants

Page 64 para 3 ligne 4 : élimine de

Page 66 para 2 ligne 1 : de ces composés

Page 68 para 2 ligne 3 : potassiques

Page 68 para 2 ligne 7 : puissants

Page 68 para 3 ligne 4 : points

Page 69 : Mettre le tableau sur une même page SVP

Page 70 : Mettre le titre sur l'autre page SVP

Page 73 para 3 : La xanthine oxydase est elle présente dans le cœur humain?

L'importance du rôle de la xanthine oxydase dans le tissu cardiaque est cependant parfois remise en question à cause de la faible activité de l'enzyme dans le tissu. Une étude a même rapporté que la xanthine oxydase n'était pas exprimée à un niveau détectable dans les cellules musculaires cardiaques humaines.

Page 76 para 2 ligne 8 : modèles expérimentaux

Page 78 ligne 6 : de ces réactions

Page 78 para 2 ligne 9 : à court terme

Page 81 para 2 ligne 4 : montré

Page 81 para 3 ligne 1 : des sources principales

Page 84 ligne 2 : susceptibles

Page 85 para 1 : Pourquoi penses-tu que cette hypothèse n'a jamais été étudiée?

Cette hypothèse n'a cependant jamais été démontrée, appuyée ou explorée sérieusement dans un modèle vivant probablement puisque les graisses saturées augmentent les LDL circulants et sont donc considérées comme étant plus nocives pour le système circulatoire que les graisses insaturées.

Page 97 para 1 dernière ligne : il manque un point

Page 99 para 2 ligne 4 : je mettrais un ; ou un : dans la phrase.

Page 99 para 2 avant-dernière ligne : faible

Page 102 para 2 ligne 1 : survécu

Page 103 para 4 ligne 5 : il (i en minuscule)

Page 113 ligne 9 : élevées

Page 118 para 2 ligne 7 : transcription

Page 123 para 3 ligne 3 : intéressés

Page 128 para 1 ligne 7 : un inhibiteur

Page 128 para 3 ligne 4 : déterminée

Page 140 titre : lettre grecque SVP.

Page 220 : Le groupe « controls » semble être le même sur les 2 graphiques. Comment les statistiques ont-elles été faites?

Pour les figures 1a et 1b, les deux expériences ont été faites à des moments différents. Les groupes témoins ont donc été refaits. Dans la figure 1a, la moyenne (SD) des témoins est de 5836 ± 791 et dans la figure 1b, la moyenne (SD) est de 6033 ± 229 .

Page 224 : enlève un 200 sur le graphique

Page 228 para 2 ligne 8 : directe

Page 228 para 2 avant-dernière ligne : amplification

Page 239 ligne 4 : intéressés

Page 243 ligne 2 : lesquels

Toutes les erreurs ont été corrigées.

Rapport d'évaluation de la thèse de doctorat de Mr Marc-André Laplante par Eric Thorin, Chercheur Agrégé du département de chirurgie de l'Université de Montréal.

Titre : La production de l'anion superoxyde par l'angiotensine, l'endothéline et les voies de signalisation dépendantes de l'acide arachidonique dans les tissus vasculaires dans le développement de l'hypertension

Commentaire général

Il s'agit d'un document très bien rédigé, très agréable à lire et très bien documenté. La revue de la littérature est très large et remonte suffisamment dans le temps pour permettre une très bonne mise en situation du problème posé par Mr Laplante. J'ai particulièrement apprécié la critique des données de la littérature concernant l'état de nos connaissances en ce qui concerne l'impact du stress oxydant sur le développement des maladies cardiovasculaires.

Il me semble cependant qu'il manque au début un paragraphe sur « l'origine des maladies cardiovasculaires ». En effet, vous faites beaucoup référence et à juste titre, aux habitudes alimentaires négligées et au style de vie sédentaire comme les responsables des maladies (si l'on exclue les maladies d'origine génétique). Pour appuyer définitivement sur ce point, il serait bon de nous rappeler les données épidémiologiques qui ont montré cela. Je pense aux données collectées dans les Iles Solomon (Taylor R, Lewis ND, Levy S. Societies in transition: mortality patterns in Pacific Island populations. Int J Epidemiol. 1989;18(3):634-646 - Page LB, Damon A, Moellering RC Jr. Antecedents of cardiovascular disease in six Solomon Islands societies. Circulation. 1974;49(6):1132-1146) ou encore sur l'Ile de Nauru (Zimmet P. Epidemiology of diabetes and its macrovascular manifestations in Pacific populations: the medical effects of social progress. Diabetes Care. 1979;2(2):144-153) lors des différentes études épidémiologiques. Il y a bien d'autres données, j'en suis certain, qui pourraient appuyer cet argument.

Ajout dans la section 1.1.2 :

Des études épidémiologiques dans les années 70-80 sur les populations urbaines et rurales des Îles Salomon et des îles du Pacifique ont montré que malgré une espérance de vie plus grande des populations développées urbaines des îles du Pacifique, des facteurs comme l'alimentation et les habitudes de vie augmentent les cas d'hypertension et de maladies cardiovasculaires comparativement aux populations ayant un mode de vie plus primitif. Un régime plus riche en hydrates de carbone, l'obésité et une consommation plus importante de sel ont été proposés comme étant des facteurs pouvant expliquer cette différence.

Commentaires spécifiques

Page 6, ligne 6 : « ...ou des thérapies préventives avant le développement de la maladie ». À mon avis, cela est peu réaliste à court terme. Il faudrait pour cela être capable de prédire l'éventualité de la maladie. Conceptuellement, la prévention thérapeutique n'est pas envisageable en raison des coûts sur le système de santé.

Ce passage a été retiré.

Page 8, dernière phrase 2nd paragraphe : « La fonction pulsatile du cœur est aussi déterminante pour le développement de la pression artérielle. » Pourriez-vous préciser votre pensée et développer ?

Texte ajouté :

La fonction pulsatile du cœur est aussi déterminante pour l'augmentation de la pression artérielle. Le débit cardiaque, qui varie en fonction du rythme et du volume d'éjection systolique du cœur, va influencer sur la pression artérielle. Par exemple, un rythme cardiaque élevé au repos est souvent associé à l'hypertension ou à un risque de mortalité plus important à cause d'une suractivation du système sympathique.

Page 10, dernière phrase 2nd paragraphe : « Par contraste, les gros...système sympathique ». Si l'on revient sur les anciens travaux de P.A. van Zwieten ou J. de Champlain (pour ne citer qu'eux), vous réaliserez que l'activité du système nerveux sympathique régule la pression artérielle surtout en imposant un tonus constant des artères de résistance. L'innervation des artères de conductance est limitée au minimum si on la compare à celle des petits vaisseaux.

Texte modifié :

Par contraste, les vaisseaux de résistance et, à un niveau moindre, les vaisseaux de conductance semblent être davantage soumis aux influences du système sympathique.

Page 21, dernière ligne : « ...compte-tenu du rôle joué par l'angiotensine II... ». Pourriez-vous préciser ? De quel rôle parlez-vous ? À quelle maladie l'angiotensine II est-elle associée ?

Texte ajouté :

Le système rénine-angiotensine, connu depuis plusieurs années, était une cible logique à cause de son influence sur la pression artérielle par le contrôle de la réabsorption tubulaire rénale et du volume sanguin et par les effets de l'angiotensine II sur le tonus vasculaire.

Page 38, dernière phrase : « L'oxydation des LDL est donc une des premières étapes du processus athérosclérotique. » C'est probablement discutable si l'on considère l'étude de Hodis et al (Circulation, 2002) qui montre que chez des patients sains, un traitement à

l'alpha-tocopherol diminue l'oxydation des LDL sans ralentir la progression de l'ATX. Cela devrait être inséré.

Bien que l'utilisation de la vitamine E comme antioxydant puisse être remise en question, cette étude est une référence pertinente et elle a été insérée dans le texte.

Page 45, ligne 7, vous écrivez qu'il est surprenant qu'il y ait eu peu ou pas d'effets secondaires associés aux antioxydants. Je crois me souvenir que dans certaines études, il y a eu une augmentation de certains cancers. À vérifier.

Texte ajouté :

Il est à souligner que certains effets des vitamines A et E et le beta-carotène sur les risques de développement du cancer sont assez controversés. Par exemple, l'étude The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial, qui comprenait 18 000 personnes à risque de développer un cancer du poumon a montré que les patients traités avec une combinaison beta-carotène et vitamine A ont un plus haut taux de mortalité attribuable aux maladies cardiovasculaires et au cancer du poumon comparativement aux patients traités avec un placebo. Il reste que ces résultats ne sont pas uniformes d'une étude à l'autre, qu'il est possible que cet effet soit limité aux vitamines, qui sont des antioxydants souvent discutables, et qu'une diminution directe des radicaux ou de leurs marqueurs produits dans l'organisme des patients traités n'a jamais été associée avec ces augmentations de risque.

Page 57 : dernière phrase finissant page 58. Il semble que les inhibiteurs de COX-2 aient montré leurs limites notamment en augmentant le risque cardiovasculaire chez des patients âgés à risques. Il faudrait donc diminuer l'impact de cette phrase.

La phrase reliant les effets de l'angiotensine II à la COX2 a été modifiée.

Il a aussi été rapporté que l'activation et la surexpression de la COX2 serait liée à l'activation de l'enzyme NAD(P)H oxydase.

Page 104, second paragraphe : pourriez-vous développer car la dernière phrase est difficile à comprendre basée sur les lignes d'avant.

Le passage a été clarifié en ajoutant une explication sur les propriétés arythmogéniques des prostanoïdes :

De plus, l'indométhacine, un inhibiteur des cyclooxygénases 1 et 2, a contribué à atténuer les arythmies dans les groupes recevant les diètes normales ou riches en graisses animales mais n'a eu aucun effet sur les groupes recevant les oméga. Le mécanisme d'action antiarythmique des oméga serait donc relié à l'activité des cyclooxygénases et à la synthèse de certaines prostanoïdes. D'ailleurs, une expérience sur des cardiomyocytes néonataux en culture a montré des propriétés arythmogéniques des prostacyclines PGD2, PGE2 et PGF2 et du thromboxane A2 alors que ces

propriétés qui sont beaucoup plus faibles pour les analogues issus du métabolisme de l'EPA (PGD3, PGE3, PGF3 et TXA3).

Correction mineures

Page 5, ligne 8 : patient avec un « s »

Page 5, ligne 9 : patients traités ~~et~~ présentaient

Page 8, dernière ligne : ~~des~~ ses vaisseaux

Page 14, ligne 9 : « sous l'effet de l'adrénaline » et j'ajouterai « de la noradrénaline ».

Page 15, ligne 2 : ~~des~~ ces impulsions

Page 15, ligne 6 : arc aortique, je pense que l'on dit plus arche ou crosse.

Page 25, ligne 4 : « ~~augmentation~~ » remplacer par diminution.

Page 32, ligne 1 : Deux récepteur avec un « s »

Page 36, dernière phrase du 1^{er} paragraphe : pourriez-vous la clarifier ?

Page 37, dernière phrase du 1^{er} paragraphe : « ...les HDL ne son... » avec un « t »

Page 47, ligne 5 : j'ajouterais la eNOS.

Page 55, ligne 3 : remplacer endothéliales par épithéliales

Page 55, dernière ligne : PGI2 entre parenthèse.

Page 58, dernière phrase : « ...une augmentation du calcium circulant... ». Il s'agit d'une augmentation de calcium intracellulaire suite à un stimulus. Revoir la référence citée.

Texte modifié :

De plus, une étude mesurant les effets d'une stimulation de la relâche de calcium sur la contraction dans les artères basilaires de chien a montré que l'activité cyclooxygénase était augmentée en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire et entraînait une augmentation de la production d'anion superoxyde par les cellules endothéliales.

Page 60, avant-dernière phrase. ...aux histamines... devient ..à l'histamine...

Page 64, avant dernière ligne. ...responsable ~~de~~ du pic...

Page 65, 5^{ème} ligne : archaebactéries devient archéobactéries.

Page 66, 1^{ère} ligne dernier paragraphe. ~~Des~~ ces composés

Page 69, 2^{ème} ligne en dessous de la légende. Il faudrait vérifier ces valeurs de demi-vie car dans mon souvenir la demi-vie du NO est plus proche de 3 sec que de 800 sec.

La demie vie du NO est dépendante de sa concentration et aussi du milieu physiologique ambiant. Les valeurs proposées ont été calculées dans un milieu aqueux. Pour éviter la confusion, des données estimées dans des systèmes avec de l'hémoglobine ont été rajoutées.

In vivo, la demi-vie du NO est probablement beaucoup plus courte à cause des réactions chimiques avec les molécules biologiques environnantes, par exemple l'hémoglobine qui réduit la demi-vie du NO à quelques secondes.

Page 71, 1^{ère} ligne : ...la NOS ~~synthase~~..

Page 71, dernière ligne, il manque un « . » après NO.

Page 77, 9^{ème} ligne, la kétansérine est un antagoniste.

Page 78, ligne 6, ...dépendants ~~des~~ ces ...

Page 81, ligne 7, ...Des études ont montrés..

Page 97, 1^{ère} ligne dernier paragraphe, manque un espace entre « A, » et « C »

Page 113, 1^{er} paragraphe, dernière phrase : remplacer ...proliférantes humaines... pour
...endothéliales humaines en prolifération...

Page 117, dernière ligne avant paragraphe 5.1. Il y a 3 fois la référence 486.

Page 120, ligne 12 : « ...hyperthrophie ventriculaire [insérer] « gauche » qui est décalé
après « ERK-MAPK ».

Toutes les corrections ont été faites.

Conclusion

Il s'agit de corrections mineures et je suis très favorable à la soutenance de cette thèse par
Mr Laplante

**RAPPORT SYNTHÈSE DE L'ÉVALUATION DE LA THÈSE
DE MONSIEUR MARC ANDRÉ LAPLANTE
(Code permanent : [REDACTED])**

Département de Pharmacologie
Faculté des études supérieures
Université de Montréal

La thèse de doctorat de Marc André Laplante, dont les travaux ont été effectués dans le laboratoire du Dr Jacques de Champlain, contient des résultats très originaux. Les résultats, nombreux, sont présentés dans la thèse sous forme de trois articles scientifiques, dont deux sont déjà publiés dans des journaux de haut facteur d'impact. Les différentes approches utilisées sont de pointes et très cohérentes dans la démarche scientifique pour étayer les hypothèses de recherche. Ces travaux contribuent certainement à l'avancement de nos connaissances sur la physiopathologie de l'hypertension artérielle, plus particulièrement, de la régulation de la production vasculaire des radicaux entre autres par l'angiotensine II, l'endothéline-1 et d'acides gras, et leur implication dans la pathogenèse de l'hypertension. La thèse fait état de nombreux principes physiologies, biochimiques et pharmacologies, aussi bien théoriques qu'expérimentaux, que l'étudiant a dû maîtriser au cours de sa formation au doctorat.

Dans l'ensemble, la thèse est bien structurée. Cependant, elle comporte une introduction longue qui pourrait être améliorée. Par contre, les résultats sont très bien présentés et l'interprétation de ceux-ci est très appropriée et bien articulée. La discussion comporte également des résultats complémentaires et certaines perspectives de recherches intéressantes. La thèse semble bien refléter les compétences scientifiques et analytiques de l'étudiant. Enfin, la qualité du texte est excellente et les fautes d'orthographe et grammaticales sont relativement rares, bien qu'il reste quelques coquilles.

Je considère donc la thèse de monsieur Marc André Laplante très bonne et elle doit être acceptée sans modification majeure. Cependant, quelques corrections et réponses à certains commentaires énoncés ci-après permettraient d'améliorer la qualité de la thèse.

J'aimerais vous féliciter, Monsieur Laplante, pour votre excellent travail et je vous souhaite bonne chance dans vos projets futurs.

Commentaires et corrections suggérées pour améliorer la qualité de la thèse :

- Le titre de la thèse me semble long. Une suggestion : Utilisez une version succincte du premier paragraphe du résumé!

Une alternative possible serait: *Étude de la production d'anion superoxyde dans les cellules de muscles lisses vasculaires du rat hypertendu.*

Cependant, il est préférable de garder le titre actuel qui, bien que beaucoup plus long, indique de façon beaucoup plus spécifique la nature des travaux.

- Mots clés : Il est surprenant de ne pas y voir les mots angiotensine et endothéline

Ces deux mots clés ont été rajoutés.

- Chapitre 1, Introduction : Bien que l'introduction soit très intéressante et comprend une revue exhaustive de la littérature pertinente, elle est relativement longue et contient quelques répétitions. Le remaniement de certaines sections permettrait d'éviter ces répétitions et de maintenir le fil conducteur en rapport avec les principes élaborés dans vos recherches et présentés dans les chapitres III à V.

Les remaniements suggérés ont été effectués

- Entre autres, la section 2.2 pourrait très bien être insérée dans la section 1 qui traite des généralités sur les maladies cardiovasculaires et l'hypertension.

Les sections ont été regroupées

- Pour des raisons similaires, la section 2.5 pourrait être incluse dans la section 1.

Les sections ont été regroupées

- La section 5, qui semble orpheline à la fin de l'introduction, devrait suivre celles sur l'Ang et l'ET-1 puisqu'on s'y rapporte dans les chapitres suivants.

La section a été déplacée

- La section 3.3.5 devrait être intégrée dans la section 3.4.1. Enfin, une révision de l'introduction permettrait de synthétiser certaines sections et d'éliminer les coquilles.

Les sections sur les vitamines ont été combinées.

- Il faudrait aussi éviter les phrases longues.

Certaines phrases ont été raccourcies dans l'introduction.

- Chapitre 1, page 8, paragraphe 2, dernière ligne : « le développement de l'hypertension » ou « l'augmentation de la pression artérielle »

Correction effectuée.

- Chapitre 1, page 11 : Indiquez les sections relatives à l'endothéline (2.4) et à l'angiotensine (2.3). Par ailleurs, inotrope doit être utilisé

Corrections effectuées.

- Chapitre 1, page 24 : « La rénine est la première étape... » est faux. De plus, le dernier paragraphe, particulièrement la 2^e phrase, est très imprécis.

Cette affirmation a été retirée. Le dernier paragraphe a été éliminé.

- Chapitre 1, page 29 : Un schéma plus complet comprenant les différentes voies de signalisation de l'Ang II serait souhaitable.

2 schémas beaucoup plus détaillés ont été rajoutés.

- Chapitre 1, page 32 : Il faudrait préciser que le récepteur ETB est présent sur les cellules endothéliales vasculaires.

La phrase suivante a été ajoutée/modifiée :

Les récepteurs ETA sont présents en plus forte concentration dans la plupart des tissus cardiovasculaires, surtout dans les artères, bien que les récepteurs ETB soient présents en quantité appréciable dans les veines et le réseau artériel pulmonaire à la surface des cellules endothéliales et musculaires lisses.

- Chapitre 1, page 77 : Le 2^e paragraphe est plutôt répétitif et le lien avec la sérotonine n'est pas clair. Est-ce nécessaire?

Ce paragraphe a été fusionné avec le paragraphe précédent. Les passages relatifs à la sérotonine sont effectivement plus ou moins nécessaires et ont été supprimés.

- Chapitre 1, page 81, paragraphe 2, ligne 4-6 : Le lien entre ET-1, NADPH et hypertension minéralocorticoïde n'est certainement pas clair pour les non-initiés.

Les minéralocorticoïdes font partie du modèle de rats hypertendus (DOCA-sel) utilisés par l'étude citée dans ce passage; modèle dans lequel la production d'endothéline dans les tissus vasculaires est augmentée. Approfondir le lien entre les minéralocorticoïdes et l'endothéline n'est pas vraiment l'objectif de cette section. Pour clarifier l'idée du passage, la phrase a été modifiée et des explications supplémentaires ont été ajoutées.

Des études récentes ont montré que l'endothéline peut activer la NAD(P)H oxydase in vivo et que les radicaux libres générés par ce mécanisme pouvaient jouer des rôles importants dans un modèle d'hypertension chez le rat induite par la désoxycorticostérone et un régime élevé en sel (DOCA-sel). En effet, dans ce modèle de rat, on observe une augmentation des niveaux d'endothéline-1 dans les homogénats d'artère carotide et un antagoniste sélectif des récepteurs ETA, le ABT-617, peut prévenir l'augmentation d'anion superoxyde dans ce tissu. L'apocynine, un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase, prévient aussi l'augmentation de la production d'anion superoxyde ce qui suggère un rôle dominant de la NAD(P)H oxydase dans la génération d'anion superoxyde dans ce modèle.

- Chapitre 1, page 85 : la section 3.3.2 est répétitive avec la section 3.2.2.4

La section 3.3.2 a été supprimée et jointe à la section 3.2.2.4.

- Chapitre 1, page 104, paragraphe 2, dernière phrase : Le lien entre l'action des oméga et les prostanoïdes n'est pas clair ici.

Un ajout a été fait pour clarifier ce lien.

Le mécanisme d'action antiarythmique des oméga serait donc relié à l'activité des cyclooxygénases et à la synthèse de certaines prostanoïdes [426]. D'ailleurs, une expérience sur des cardiomyocytes néonataux en culture a montré des propriétés arythmogéniques des prostacyclines PGD2, PGE2 et PGF2 et du thromboxane A2; propriétés qui sont beaucoup plus faibles pour les analogues issus du métabolisme de l'EPA (PGD3, PGE3, PGF3 et TXA3) [427].

- Chapitre III, IV & Discussion : Suite aux résultats obtenus avec l'Ang II et l'ET-1 dans les cellules musculaires lisses en culture, il est proposé que l'Ang II active directement la voie ERK-MAPK à court terme et indirectement par l'ET-1 à long terme. Cependant, l'ET-1, qui active aussi la voie ERK-MAPK, ne produit pas d'effet biphasique sur la production de radicaux. Comment expliquez-vous ce phénomène? Par conséquent, le schéma à la page 232 est plutôt spéculatif et le schéma à la page 233 semble présenter certaines contradictions. Puisque le PD98059 bloque complètement la production de radicaux, l'activation de la voie ERK-MAPK semble indispensable à l'activation de la NADPH oxydase et, possiblement la production d'ET-1, par l'Ang II. Par la suite, l'ET-1 activerait la production de radicaux en maintenant l'activité de la voie ERK-MAPK. Ces concepts et schémas doivent donc être révisés.

L'endothéline active la production de radicaux de façon soutenue par la NAD(P)H oxydase. Les mécanismes impliqués dans cette production, comme l'activité de la voie ERK-MAPK, restent à déterminer. Il existe une différence entre l'effet de l'angiotensine II et de l'endothéline sur la NAD(P)H oxydase. Le mécanisme de l'angiotensine II est clairement ERK-MAPK-dépendant, mais nous n'avons pas mesuré l'effet du PD98059 sur la production d'anion superoxyde par l'endothéline.

Le carré 'Maintient de l'activation de la voie ERK-MAPK' a été enlevé puisque cette étape n'est pas nécessairement impliquée dans la production soutenue de l'anion superoxyde.

- Chapitre IV : Cette version de la publication comporte quelques coquilles.
- Chapitre IV, page 194 : Comment expliquer l'effet antihypertenseur très tardif du LU302872.

Apparemment, tous les effets de l'angiotensine ne sont pas dépendant de l'endothéline. Par exemple, l'angiotensine est un vasoconstricteur, un stimulant pour le système sympathique et augmente la réabsorption sodée au niveau des tubules rénaux. Un blocage des récepteurs de l'endothéline ne parvient donc pas à prévenir l'activation de tous ces mécanismes. De plus, l'endothéline prévient la production tardive soutenue d'anion superoxyde, mais non la production rapide d'anion superoxyde stimulée par l'angiotensine.

Les effets presseurs de l'angiotensine II sont par contre presque totalement prévenus par un antioxydant (acide alpha-lipoïque). La production rapide d'anion superoxyde serait donc un élément déclencheur important pour l'augmentation de la pression artérielle et l'incapacité des antagonistes des récepteurs de l'endothéline à empêcher cette production rapide est probablement la cause du manque d'effet antihypertenseur du LU302872 dans les premiers jours du traitement.

Après quelques jours, les effets oxydants initiaux de l'angiotensine II s'estompent et la production soutenue tardive d'anion superoxyde par l'endothéline joue un rôle de plus en plus important dans le maintien de la pression artérielle.

- Chapitre V : Les inhibiteurs des COX sont inefficaces à réduire la production de radicaux induite par l'AA. Puisque la COX-2 semble être l'isoforme susceptible d'induire la production de radicaux, l'AA ne devrait pas stimuler l'expression de la COX-2. À vérifier!

D'abord, un traitement avec des inhibiteurs des COX semble diminuer légèrement la production d'anion superoxyde par l'AA, ce qui serait probablement attribuable à la stimulation de l'expression de la COX-2 par l'AA ou par d'autres produits du métabolisme de l'AA. Cependant, nos résultats montrent que l'anion superoxyde généré en réponse à l'AA provient d'abord majoritairement de sources différentes, en particulier la 12-LOX. De plus, la disponibilité du substrat AA pour les COX n'est peut-être pas un facteur limitant de l'enzyme. De sorte que la quantité absolue de AA dans la cellule n'affecte pas nécessairement la vitesse de l'enzyme.

- Chapitre V, page 223 : Remplacer « a force transducer » par « a pressure transducer »

Correction effectuée

- Chapitre VII : devrait être Chapitre VI

Correction effectuée. Les autres chapitres ont aussi été ajustés.

- Chapitre VI, page 230, ligne 2 : Il faudrait spécifier que l'anion superoxide est un facteur déterminant dans le développement de l'hypertension induite par l'Ang II. En effet, les antioxydants ne sont pas prouvés efficaces dans tous les cas d'hypertension, particulièrement chez l'humain. De plus, dans le chapitre V, il est évidant que l'augmentation de la production de radicaux ne cause pas systématiquement d'hypertension.

Cette précision a été ajoutée.

- Chapitre VI, page 232 : Dans la légende de la figure, il est important de spécifier « la production d'anion superoxyde par l'Ang II ... »

Correction effectuée

CORRECTIONS ADDITIONELLES

- Le troisième article a été remplacé par la version la plus récente.
- La pagination a été revue et modifiée.
- Les chapitres, numéros de figures et la table des matières ont été restructurés afin de s'adapter aux différentes corrections.
- Certaines imprécisions et erreur typographiques ont été corrigées dans la bibliographie
- Une section, réponse aux arbitres, a été rajoutée.
- La table 2, chapitre 1 a été clarifiée. Les oméga-3 calculés représentent l'acide alpha-linolénique et non pas l'ensemble des oméga-3. Les sources d'oméga de type animales ont été retirées pour éviter une confusion (ces sources étant surtout riches en DHA et EPA).